

# CHEMISCHE MODIFIZIERUNG VON NATIVEM HAFER · PHYTOCHROM

PETRA · HEIDI EILFELD

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



CHEMISCHE MODIFIZIERUNG  
VON NATIVEM HAFER-PHYTOCHROM

DISSERTATION  
DER  
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE  
DER  
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT, MÜNCHEN

VORGELEGT  
VON  
PETRA HEIDI EILFELD  
AUS  
MÜNCHEN

---

FÜRSTENFELDBRUCK, DEZEMBER 1987

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. RÜDIGER

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. SCHEER

Tag der mündlichen Prüfung : 21. Januar 1988

Für die Erkenntnis gibt es keine endgültigen  
Ziele, sondern der Fortschritt ist nichts als  
eine Differenzierung der Fragestellungen.

( Hermann Hesse )



Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. RÜDIGER am Botanischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität, München, in der Zeit von Januar 1985 bis Oktober 1987 durchgeführt. Herrn Prof. Dr. RÜDIGER bin ich für die Themenstellung, die Betreuung der Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft zu großem Dank verpflichtet.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. Chr. BRÄUCHLE, Herrn Prof. Dr. H. SCHEER und Herrn Prof. Dr. S. SCHWEIDER danken, die mir in zahlreichen Detailproblemen hilfreiche Ratschläge erteilten, insbesondere in Bezug auf die biophysikalischen Untersuchungen. Ein Großteil der kinetischen Messungen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. F.-W. DEEG, Herrn Dr. R. MAURER, Frau Dr. H. SLAMA und Herrn Dr. J. VOGEL durchgeführt, alle Versuche zur in vitro Transcription gemeinsam mit Herrn Dr. D. ERNST und Herrn Dr. F. PFEIFFER.

Als Praktikanten des Physiologisch-botanischen Großpraktikums II bzw. des Phytochemischen Fortgeschrittenenpraktikums arbeiteten die Damen und Herren C. ANDERL, B. BRAUNER, A. BUCHNER, Th. GRIMM, S. GUS, M. HÖFER, P. LAUTERBACH, H. LUDL, A. STRUCK und Chr. WIESNER mit viel Fleiß und Geschick am experimentellen Programm mit. Ihnen möchte ich ebenso danken wie auch den stets engagierten und gewissenhaften Assistentinnen Frau H. MALINOWSKI und Frau G. WIDERER. Auch möchte ich nicht versäumen, meiner Kollegin S. GUS, meinen Kollegen R. FISCHER und S. SIEBZEHRDRL sowie Herrn Prof. Dr. P.-S. SONG für zahlreiche Diskussionen und für manchen nützlichen praktischen Hinweis meinen Dank auszusprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. H. HOPF, der mir in allen Lebenslagen stets fachlich und persönlich mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Mann Peter möchte ich herzlich für alle mir erwiesene Unterstützung danken und für seine Geduld, die das Zustandekommen dieser Arbeit erst möglich gemacht hat.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes danke ich für ein Stipendium, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung,



TEILE DIESER ARBEIT WURDEN BEREITS VERÖFFENTLICHT :

1. *Eilfeld, P.H. und P.G. Eilfeld* (1988). Circular dichroism of phytochrome intermediates. *Physiol. Plantarum*, eingereicht
2. *Eilfeld, Peter, Petra Eilfeld und W. Rüdiger* (1986). On the primary photoprocess of 124 kdalton phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 44, 761-769
3. *Eilfeld, Peter, Petra Eilfeld, J. Vogel und R. Maurer* (1987). Evidence for a sequential pathway from  $P_R$  to  $P_{fr}$  of the phototransformation of 124 kDa oat phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 45, 825-830
4. *Eilfeld, P.H., R. Maurer, J. Vogel und P.G. Eilfeld* (1988). Laser flash photolysis of 124 kDa oat phytochrome: Studies concerning the late steps of photoconversion  $P_R$  to  $P_{fr}$ . *J. Photochem. Photobiol.*, eingereicht
5. *Eilfeld, Petra H., G. Widerer, H. Malinowski, W. Rüdiger und Peter G. Eilfeld* (1988). Topography of the phytochrome molecule as determined from chemical modification of SH groups. *Biosciences*, im Druck
6. *Ernst, D., F. Pfeiffer, P.G. Eilfeld, P.H. Eilfeld, W. Rüdiger und D. Oesterheld* (1987). Phytochrome regulation of mRNA levels of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and light harvesting chlorophyll a/b protein in etiolated rye seedlings (*Secale cereale* L.). In v. WETTSTEIN und CHUA (Eds.), *Plant Molecular Biology*, NATO ASI-Serie (S. 679-688). New York; Plenum Publishing Corporation
7. *Scheer, H., S. Siebzehnrübl, R. Fischer, P.G. Eilfeld, P.H. Eilfeld und W. Rüdiger* (1986). Photochemistry of the chromophores in 124 kDa phytochrome and in model compounds. *Photochem. Photobiol.* 43 Suppl., 118



# INHALT

|                                                                                                                    | <u>SEITE</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Abkürzungen .....                                                                                                  | 5            |
| 1. <u>EINLEITUNG</u> .....                                                                                         | 7            |
| 2. <u>MATERIAL UND METHODEN</u> .....                                                                              | 12           |
| 2.1. Verwendete Materialien und Geräte .....                                                                       | 12           |
| 2.2. <u>Isolierung und Reinigung von nativem Phytochrom</u> .....                                                  | 14           |
| 2.2.1. Trypsinabbau von nativem Phytochrom .....                                                                   | 16           |
| 2.3. <u>Biochemische Untersuchungen</u> .....                                                                      | 17           |
| 2.3.1. <u>Durchgeführte Reaktionen und Bestimmung der Anzahl</u><br><u>modifizierter Aminosäuren</u> .....         | 17           |
| 2.3.1.1. <i>8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure</i> (ANS) ..                                                         | 17           |
| 2.3.1.2. <i>Fluor-2,4-dinitrobenzol</i> (FDNB) .....                                                               | 18           |
| 2.3.1.3. Quecksilberorganische Verbindungen .....                                                                  | 18           |
| - <i>p</i> -Chloromercuribenzoessäure (PCMB) und<br><i>p</i> -Chloromercuribenzoessulfonsäure (PMBS) ..            | 18           |
| - <i>Fluoresceinquecksilberacetat</i> (FMA) ...                                                                    | 18           |
| 2.3.1.4. <i>N</i> -(1-Pyrenyl)maleimid (PMI) .....                                                                 | 19           |
| 2.3.1.5. <i>5,5'-Dithiohis(2-nitrobenzoessäure)</i> (DTNB)<br>und <i>2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure</i> (NTCB) .. | 19           |
| - Spaltung mit NTCB .....                                                                                          | 19           |
| 2.3.1.6. <i>Fluoresceinisothiocyanat</i> (FITC) .....                                                              | 20           |
| 2.3.1.7. <i>N-Iodoacetyl-N'-(8-sulfo-1-naphthyl)-</i><br><i>ethylendiamin</i> (IAEDANS) .....                      | 20           |
| 2.3.2. <u>Trypsin-Abbau</u> .....                                                                                  | 20           |
| 2.3.2.1. FMA-modifiziertes Phytochrom .....                                                                        | 20           |
| 2.3.2.2. 1,8-IAEDANS- und FITC-modifiziertes<br>Phytochrom .....                                                   | 21           |
| 2.3.3. SDS-Gelelektrophorese .....                                                                                 | 21           |
| 2.4. <u>Biophysikalische Untersuchungen</u> .....                                                                  | 21           |
| 2.4.1. <u>Tiefemperatur-Absorptionsspektroskopie</u> .....                                                         | 21           |
| 2.4.1.1. Deuterierung .....                                                                                        | 22           |
| 2.4.1.2. Absorptionsspektren .....                                                                                 | 22           |



|                                                                                                                                | <u>SEITE</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 2.4.1.3. Bestimmung der Quantenausbeuten .....                                                                                 | 23           |
| 2.4.1.4. Kinetische Analyse .....                                                                                              | 25           |
| 2.4.2. <u>Laserblitz-Absorptionsspektroskopie</u> .....                                                                        | 25           |
| 2.4.2.1. Laserblitz-Photolyse .....                                                                                            | 25           |
| 2.4.2.2. Kinetische Analyse .....                                                                                              | 27           |
| 2.4.3. Circular-Dichroismus .....                                                                                              | 28           |
| 2.5. <u>Molekularbiologische Untersuchungen</u> .....                                                                          | 28           |
| 2.5.1. Isolierung von Zellkernen aus etiolierten Hafer-<br>keimlingen .....                                                    | 28           |
| 2.5.2. Nachweis von Phytochrom an Zellkernen durch ELISA .                                                                     | 30           |
| 2.5.3. Bindung von modifiziertem Phytochrom an Zellkerne .                                                                     | 31           |
| 2.5.4. Genregulation .....                                                                                                     | 31           |
| 3. <u>ERGEBNISSE</u> .....                                                                                                     | 32           |
| 3.1. <u>Biochemie modifizierter Phytochrome</u> .....                                                                          | 32           |
| 3.1.1. Nicht-kovalente Modifizierung .....                                                                                     | 32           |
| 3.1.2. <u>Kovalente Modifizierung des Apoproteins</u> .....                                                                    | 32           |
| 3.1.2.1. Modifizierung mit <i>Fluor-2,4-dinitrobenzol</i><br>(FDNB) .....                                                      | 35           |
| 3.1.2.2. Spezifische Modifizierung von SH-Gruppen                                                                              | 39           |
| - Durchgeführte Reaktionen .....                                                                                               | 39           |
| - Einflüsse auf die Chromophor-Absorption                                                                                      | 42           |
| - Peptid-Kartierung .....                                                                                                      | 49           |
| 3.2. <u>Biophysik modifizierter Phytochrome</u> .....                                                                          | 59           |
| 3.2.1. <u>Tiefemperatur-Absorptionsspektroskopie</u> .....                                                                     | 59           |
| 3.2.1.1. Primärer Photoprozeß .....                                                                                            | 61           |
| - Deuterierung von nativem Phytochrom ..                                                                                       | 63           |
| - Modifizierung mit <i>Fluor-2,4-dinitrobenzol</i> (FDNB) und <i>8-Anilino-1-naphthalin-</i><br><i>sulfonsäure</i> (ANS) ..... | 70           |
| 3.2.1.2. Folgeprozesse .....                                                                                                   | 73           |
| 3.2.1.3. Rückreaktion .....                                                                                                    | 74           |

|                                                                          | <u>SEITE</u> |
|--------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 3.2.2. <u>Laserblitz-Absorptionsspektroskopie</u> .....                  | 75           |
| 3.2.2.1. Kinetik der Photokonversion von $P_r$ .....                     | 77           |
| 3.2.2.2. Umgebungseinflüsse auf die Photokonver-<br>sion von $P_r$ ..... | 82           |
| 3.2.2.3. Einfluß der Protein-Oberfläche .....                            | 87           |
| 3.2.3. <u>Circular-Dichroismus</u> .....                                 | 88           |
| 3.2.3.1. Circular-Dichroismus der Phytochrom-<br>Intermediate .....      | 89           |
| 3.2.3.2. Induzierter Circular-Dichroismus .....                          | 93           |
| 3.3. <u>Molekularbiologische Aspekte</u> .....                           | 95           |
| 3.3.1. Nachweis von Phytochrom an isolierten Zellkernen ..               | 95           |
| 3.3.2. Bindung von modifiziertem Phytochrom an Zellkerne .               | 98           |
| 3.3.3. Genregulation bei isolierten Zellkernen .....                     | 98           |
| 4. <u>DISKUSSION</u> .....                                               | 101          |
| 4.1. Chemische Reaktivität .....                                         | 101          |
| 4.2. Photochemie und Photobiophysik .....                                | 103          |
| 4.3. Modellvorstellungen zur Phytochromwirkung .....                     | 107          |
| 5. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u> .....                                          | 108          |
| 6. <u>LITERATUR</u> .....                                                | 111          |



## ABKÜRZUNGEN

|                      |                                                                                                                                                                                  |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABTS                 | 2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure), Ammoniumsalz                                                                                                                |
| ANS                  | 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure, Ammoniumsalz                                                                                                                                  |
| CD                   | Circular-Dichroismus                                                                                                                                                             |
| DTNB                 | 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)                                                                                                                                              |
| ELISA                | enzymgekoppelte, trägergebundene Antikörperreaktion ("enzyme linked immuno sorbent assay")                                                                                       |
| FDNB                 | Fluor-2,4-dinitrobenzol ("Sanger's Reagens")                                                                                                                                     |
| FITC                 | Fluoresceinisothiocyanat                                                                                                                                                         |
| FMA                  | Fluoresceinquecksilberacetat                                                                                                                                                     |
| 1,8-IAEDANS          | N-Iodoacetyl-N'-(8-sulfo-1-naphthyl)-ethylendiamin                                                                                                                               |
| kDa                  | kilodalton                                                                                                                                                                       |
| KPP                  | Kaliumphosphat-Puffer                                                                                                                                                            |
| KPP-D                | Kaliumphosphat-Puffer, Lösungsmittel D <sub>2</sub> O statt H <sub>2</sub> O                                                                                                     |
| lumi-F               | erstes Intermediat der Photokonversion von P <sub>fr</sub> zu P <sub>r</sub>                                                                                                     |
| lumi-R               | erstes Intermediat der Photokonversion von P <sub>r</sub> zu P <sub>fr</sub>                                                                                                     |
| MES                  | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure                                                                                                                                                |
| meta-F               | zweites Intermediat der Photokonversion von P <sub>fr</sub> zu P <sub>r</sub>                                                                                                    |
| meta-R <sub>a</sub>  | zweites Intermediat der Photokonversion von P <sub>r</sub> zu P <sub>fr</sub>                                                                                                    |
| meta-R <sub>ac</sub> | drittes Intermediat der Photokonversion von P <sub>r</sub> zu P <sub>fr</sub><br>(bei nativem Phytochrom in 66% Glycerin, zwischen meta-R <sub>a</sub> und meta-R <sub>c</sub> ) |
| meta-R <sub>c</sub>  | drittes Intermediat der Photokonversion von P <sub>r</sub> zu P <sub>fr</sub><br>(bei nativem Phytochrom in wässrigem Medium)                                                    |
| NTCB                 | 2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure                                                                                                                                                  |
| OPDA                 | 1,2-Diaminobenzol, Dihydrochlorid ("o-Phenylendiamin")                                                                                                                           |
| P <sub>λ</sub>       | Phytochromform mit von P <sub>r</sub> bzw. P <sub>fr</sub> abweichenden Spektraleigenschaften; $\lambda = \lambda_{\max}$                                                        |
| P <sub>bl</sub>      | gebleichtes Phytochrom; wird bei Raumtemperatur anstelle von P <sub>fr</sub> gebildet ( $\lambda_{\max} = \text{ca. } 650 \text{ nm}$ )                                          |
| PCMB                 | p-Chloromercuribenzoessäure                                                                                                                                                      |
| P <sub>fr</sub>      | dunkelrot (um 730 nm) absorbierende Phytochromform                                                                                                                               |
| PMBS                 | p-Chloromercuribenzolsulfonsäure                                                                                                                                                 |
| PMI                  | N-(1-Pyrenyl)-maleimid                                                                                                                                                           |
| P <sub>r</sub>       | hellrot (um 667 nm) absorbierende Phytochromform                                                                                                                                 |
| SAR                  | Reinheitsindex ("specific absorbance ratio") = $A_{667} (P_r) : A_{280}$                                                                                                         |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat                                                                                                                                                             |



## 1. EINLEITUNG

Die Lichtabhängigkeit physiologischer Prozesse bei Pflanzen ist eine der augenfälligsten und bedeutsamsten Eigenschaften. Hierzu gehören z.B. die lichtgesteuerte Ergrünung zunächst beinahe farbloser ("vergeilter") junger Pflanzensprosse sowie die Induktion der Samenkeimung bei Lichtkeimern (z.B. Kopfsalat, *Lactuca sativa*). Bereits in den fünfziger Jahren wurde als Auslöser der beobachteten Effekte ein Lichtrezeptor postuliert, der in zwei Formen vorliegt, die durch Licht ineinander übergeführt werden können (BORTHWICK et al., 1952). Im Jahre 1959 gelang schließlich die Isolierung dieses Rezeptors, dh. die Extraktion eines Pigments, dessen optische und photophysikalische Eigenschaften mit den Versuchen von BORTHWICK et al. in Einklang standen (BUTLER et al., 1959). Es dauerte nur wenige Jahre, bis seine Proteidnatur entdeckt wurde (BUTLER et al., 1964) und auch der lichtabsorbierende Chromophor identifiziert werden konnte (RÜDIGER und CORELL, 1969). Durch diese Untersuchungen konnte bestätigt werden, daß es sich bei dem isolierten Rezeptor um ein photochromes Chromoprotein höherer Pflanzen handelte, das aus diesem Grunde "*Phytochrom*" genannt wurde.

Aufgrund der vergleichsweise hohen Empfindlichkeit des Phytochroms, insbesondere gegenüber Proteasen, dauerte es allerdings ziemlich lange, bis endlich ein "natives" Pigment isoliert werden konnte (KERSCHER, 1983; VIERSTRA und QUAIL, 1983), dh. ein Phytochrom, dessen Eigenschaften dem Pigment in der lebenden Pflanze weitgehend ähnlich waren. Seine außergewöhnlich hohe Molekularmasse (124 000 dalton) erschwerte außerdem viele Untersuchungen. Experimentelle Ansätze aus den Jahren vor 1983 (die sich unwissentlich auf degradiertes Phytochrom, dh. auf Phytochrom geringerer Proteinmasse bezogen hatten) mußten und müssen auch weiterhin überprüft werden, zahlreiche Ansichten und Modelle wurden bereits revidiert.

Die Primärstruktur des Phytochrom-Proteins konnte von HERSHEY et al. (1985) aus der Polynucleotidsequenz abgeleitet werden. Allerdings trägt diese Information allein nichts dazu bei, den Mechanismus der physiologischen Phytochromwirkung besser zu verstehen. In Zusammenhang mit dieser Fragestellung wurden zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur, insbesondere auch in Hinblick auf Unterschiede zwischen beiden Phytochromformen ( $P_r$  und  $P_{fr}$ ), bisher bei nativem Phytochrom ebenfalls nur Teilaspekte bear-

beitet. So verhielten sich beide Formen unterschiedlich bei Proteolyseversuchen, und zwar einerseits hinsichtlich der Spaltungskinetik und andererseits bezüglich der Spaltstellen (LAGARTIAS und MERCURIO, 1985). Ebenso waren bestimmte monoclonale Antikörper in der Lage, zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  zu unterscheiden (THOMAS et al., 1984; CORDONNIER et al., 1985; THOMAS und PENN, 1986), was auf Konformationsänderungen an der Proteinoberfläche hinweist. Es ist jedoch sehr wahrscheinlich, daß diese auf relativ kleine Bereiche begrenzt bleiben, da sich die Raumstruktur des Phytochromproteins als Ganzes bei der Photokonversion nach Beobachtungen von SONG (1985) praktisch nicht verändert.

Um nun Aufschlüsse über Sekundär- und Tertiärstruktur sowie über die Stabilität einzelner Proteinkonformationen zu erhalten, wurden in der Literatur bereits zahlreiche nicht kovalent bindende, jedoch die Protein-Eigenschaften beeinflussende (also modifizierende) Substanzen beschrieben, wie z.B. Polysaccharide, Detergentien oder Derivate der *8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure* (ANS). Insbesondere ergab die Einwirkung von unsubstituiertem ANS auf natives (dh. 124 kDa) Phytochrom definierte Species mit eingeschränkter Photoreversibilität (P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1984). Vergleichbare photochemische Eigenschaften fanden YAMAMOTO und FURUYA (1983) für kleinere proteolytische Spaltprodukte mit Molekularmassen um 40 kDa aus 124 kDa-Erbse phytochrom (Wie REIFF et al. 1985 zeigen konnten, gilt Ähnliches für die Proteolyse von nativem Haferphytochrom.). Allerdings gelang es bisher nicht, ANS-intercaliertes Phytochrom zu isolieren, da die Einlagerung sowohl bei Gelchromatographie als auch bei Ammonsulfat-Fällung reversibel war oder Denaturierung eintrat. Ein weiterer grundsätzlicher Nachteil dieser Methoden besteht darin, daß eine genaue Lokalisierung der Bindungsorte von nicht-kovalent modifizierenden Reagentien praktisch nicht möglich ist. Zur Erweiterung derzeitiger Vorstellungen über Struktur und Funktionsweise nativen Phytochroms waren daher völlig neue gedankliche und methodische Ansätze erforderlich.

Einige Eigenschaften des Phytochroms weisen Ähnlichkeiten mit denen schon länger bekannter Photorezeptoren wie *Rhodopsin* oder *Bacteriorhodopsin* auf. So wurde z.B. als photochemischer Primärprozeß eine *cis-trans*-Isomerisierung des Tetrapyrrol-Chromophors postuliert (RÜDIGER et al., 1985). In der Folge wurden Relaxationsvorgänge des Chromophors und des Proteins angenommen, die schließlich in Konformationsänderungen auf der Proteinober-

fläche resultieren. Diese letzteren sind vermutlich für die molekulare Wirkung des Pigments in der lebenden Pflanze ursächlich verantwortlich und lösen eine Kaskade von physiologischen Vorgängen aus.

Die bereits sehr früh geäußerte Idee, daß es sich bei Phytochrom um ein *lichtgesteuertes Enzym* handeln könnte (vgl. z.B. den Übersichtsartikel von PRATT, 1978), erlangte in jüngster Zeit neue Aktualität, als im Zusammenhang mit gereinigten Phytochrompräparaten Kinase-Aktivität beobachtet wurde (WONG et al., 1986) und LAGARIAS darüber hinaus auch Sequenzhomologien von Phytochrom mit bestimmten Kinasen fand (vorgetragen auf der XVI. Yamada-Konferenz, Okazaki, Japan, 1986). In diesem Zusammenhang wurden besonders chemische Modifizierungen als aussichtsreich angesehen, da sich enzymatisch aktive Stellen grundsätzlich auch durch hohe chemische Reaktivität auszeichnen.

In der Enzym-Biochemie gehören *chemische Modifizierungen* zu den Standardverfahren, um wertvolle Hinweise auf die Raumstruktur der betrachteten Proteine zu erhalten (vgl. MEANS und FEENY, 1971; GLAZER et al., 1982; MAYR et al., 1982); Wichtige Anwendungen fanden hierbei insbesondere selektiv modifizierte Aminosäuren (dh. im Idealfall 1 Aminosäure in einer definierten Position) als Sonde für Konformationsänderungen (TSONG und BALDWIN, 1972) oder gezielte Fluoreszenzmarkierung (wie bei Rhodopsin, vgl. WU und STRYER, 1972). Auf diese Weise konnte Klarheit über vielfältige kooperative Phänomene gewonnen werden; allerdings war dieses Vorgehen nur in den seltensten Fällen erfolgreich, insbesondere bei einfachen Proteinen mit bekannter Sequenz. Da Phytochrom jedoch eine ungewöhnlich hohe Molekularmasse besitzt (s.o.) und nach wie vor die genaue räumliche Struktur nicht bekannt ist, sind ähnliche Untersuchungen hier bereits prinzipiell mit erheblichen Problemen verbunden. Seine im Vergleich zu anderen strukturell verwandten Chromoproteiden (z.B. *Phycocyaninen*) geringe Stabilität *in vitro* (bezügl. pH-Wert, Licht, Temperatur, Ionenstärke u.ä.) bedingt darüber hinaus zahlreiche praktische Schwierigkeiten.

Außerdem besteht die Möglichkeit, daß auf hydrolytischem Wege Degradierung zu 114 / 118 kDa- oder 59 kDa Phytochrom eintritt (OESTERHELT, unveröffentlicht); ebenso ist bei Verwendung von nicht-wässrigen Systemen Degradierung oder Denaturierung möglich. Natives Phytochrom ist jedoch in bis zu 50%igem Ethylenglycol stabil, das folglich als gutes Lösungsmittel für hydrophobe Reagentien verwendet werden konnte.

In seiner Eigenschaft als Chromoprotein bedingt Phytochrom darüber hinaus zahlreiche weitere Schwierigkeiten bei der chemischen Modifizierung. So ist bereits die Auswahl geeigneter Methoden in mehrfacher Hinsicht begrenzt: Einerseits kann der Phytochrom-Chromophor selbst leicht (oder leichter als die Proteinkomponente) reagieren (SONG, 1985), andererseits sind Modifizierungen oft nicht selektiv (MEANS und FEENY, 1971; GLAZER et al., 1982), bzw. die eingesetzten Reagentien oder die erforderlichen Reaktionsbedingungen wirken mehr oder weniger denaturierend (BUTLER et al., 1964; RÜDIGER, 1972). Änderungen der photochemischen Eigenschaften können daher nicht nur eine Folge der chemischen Modifizierung bestimmter Aminosäuren sein, sondern auch auf unerwünschten Chromophor-Reaktionen oder auf Änderungen der Tertiär- / Quartär-Struktur des Proteins beruhen.

Vergleichende Untersuchungen über die *chemische Reaktivität* des Proteins, wie sie für 114 / 118 kDa Phytochrom bereits durchgeführt worden waren (HERMANN und MÜLLER, 1980; HUNT und PRATT, 1981), fehlten für 124 kDa Phytochrom bisher völlig. Bei diesen frühen Untersuchungen hatten sich Unterschiede in der chemischen Reaktivität von  $P_r$  und  $P_{fr}$  gezeigt; dies wurde bereits damals als unterschiedliche Exposition einiger weniger Aminosäuren bzw. als unterschiedliche Raumstruktur interpretiert. Wie von P.G. EILFELD und RÜDIGER (1984) gezeigt werden konnte, können diese Unterschiede allerdings auch eine Folge von Proteolyse sein. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang exponierte Reste in Chromophornähe wie z.B. *Histidin* (THÜMLER et al., 1983) oder *Lysin* (P.H. EILFELD, 1984), die allerdings in großer Anzahl vorkommen und ziemlich gleichmäßig über das gesamte Protein verteilt sind. Wegen der geringeren Häufigkeit von *Cystein*-Resten (23 bei nativem Phytochrom, vgl. HERSHEY et al., 1985) und der relativ hohen Spezifität hierfür geeigneter Reagentien (insbesondere quecksilberorganischer Verbindungen) wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit deshalb neben der Untersuchung allgemeiner Umgebungseffekte vor allem auf die kovalente Modifizierung von SH-Gruppen gelegt. Auf diese Weise wurde eine Lokalisierung der oben erwähnten aktiven Bereiche des Proteins erhofft. Weiterhin eröffneten sich Möglichkeiten gezielter Störungen der Proteinkomponente (in Anlehnung an die Enzymnomenklatur im folgenden "Apoprotein" genannt) sowie des Einbaus chemischer Sonden.

Um nun auch Aufschlüsse über die *Funktion* dieser Bereiche zu erhalten, wurden zwei unabhängige Ansätze verfolgt. So existierte bislang noch keine allgemein akzeptierte Vorstellung über die Beteiligung der Proteinkomponente bei den einzelnen Schritten der Photokonversion beider Formen. Nach Arbeiten von P.G. EILFELD und RÜDIGER (1985) sowie REIFF et al. (1985) schienen jedoch einzelne Domänen des Apoproteins hierbei recht spezifische Funktionen zu erfüllen. Aus diesem Grund wurde erwartet, nach Einführung geeigneter chemischer Sonden strukturelle Veränderungen der Proteinoberfläche erstmalig direkt, dh. unabhängig von der Absorption des Tetrapyrrol-Chromophors, beobachten zu können. Durch *in vitro* Experimente sollte schließlich die Bedeutung der chemisch reaktiven Bereiche für die physiologische  $P_{fr}$ -Wirkung untersucht werden. Als ein derartiges *in vitro* System bot sich die phytochromabhängige Transcription von Zellkerngenen an, da hier die gewünschten Effekte relativ rasch eintreten (ERNST und OESTERHELT, 1984; QUAIL et al., 1986). Damit wäre eine Überprüfung des oben vorgestellten Modells zur Funktion dieses Photorezeptors möglich, was auch zur Klärung der Frage beitragen könnte, inwieweit es universelle, für Photorezeptoren allgemein typische Eigenschaften gibt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE

#### Pflanzenmaterial

Zertifiziertes Saatgut *Avena sativa* L., Sorte "Pirol", Nordostbayerischer Saatbauverband, Marktredwitz

#### Chemikalien

*Ethylenglycol* p.A. wurde von Merck, Darmstadt, bezogen,  $(OD)_3$ -Glycerin von MSD Isotopes, Canada, alle anderen Reagentien (Reinheitsgrad jeweils p.A.) von Sigma Chemie, Deisenhofen

#### Säulenmaterialien

- *Hydroxylapatit*: Calbiochem, Nr. 391948, Behring Diagnostics, Hoechst, La Jolla, Californien, USA
- *Biogel A-1.5 m*: Bio-RAD, Uppsala, Schweden

#### ELISA

Nuncclon-Mikrotiterplatten, Nunc, Wiesbaden

#### Zentrifugen

- Wäscheschleuder (Thomas) mit 6 l-Edelstahltrommel (nur zur Phytochrom-Extraktion)
- Vacuum-Kühlzentrifuge G 50 K, WKF, Brandau, mit Rotoren 38, 100, 250 und 500 ml
- Kühlzentrifuge Rotixa / K, Hettich, Tuttingen (zur Zellkernisolierung)
- Mikroliter-Zentrifuge, Hettich, Tuttingen (für Eppendorfgefäße)

#### Spektralphotometer

- Zweistrahl-Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator, Zeiss, Oberkochen, und Fluoreszenz-Zusatzausrüstung ZFM 4, Zeiss, Oberkochen
- Zweistrahl-Spektralphotometer 320 und 551 S, Perkin-Elmer, Überlingen
- Zweiwellenlängen-Spektralphotometer ZWS II, Sigma, Berlin, mit angeschlossener Thermostatisier-Einrichtung, Haake, Berlin; auch im Zweistrahlbetrieb; verbunden mit programmierbarem elektronischen Rechner

8110 mit Speichermöglichkeit und integriertem Schreiber, Bascom Turner Instruments, Massachusetts, USA

- Diodenarray-Spektralphotometer HP 8451 A mit integriertem Rechner 9121 und Speichermöglichkeit, Hewlett Packard, San Diego, Californien, USA
- Durchflußphotometer Uvicord II, LKB, Schweden; Registrierwellenlänge 280 nm; angeschlossen an Schreiber, Typ WPS 1, Colora, Lorch und an Rundtellerfraktionensammler Typ "Mini Escargot", Gilson, Frankreich

#### Stickstoff-Kühleinrichtung für Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie

Eigenbau: Werkstatt des Botanischen Institutes, Ludwig-Maximilians-Universität, München

#### Belichtungseinrichtungen

- für DMR 22:

Lichtquelle: 12 V-Lampe mit Schutzfilter; Interferenzfilter 660.3 nm (Halbwertsbreite 12.8 nm, maximale Transmission 78 %, Lichtflußrate  $64 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$ ) und 728.3 nm (14 nm, 75 %,  $31 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$ )

- für Perkin-Elmer 320, ZWS II und HP 8451 A:

Lichtquelle: Lichtversorgung Volpi Intralux 150 H, Volpi, Denzlingen, mit Glasfaser-Lichtleiter; Interferenzfilter 660 nm (Halbwertsbreite 10.1 nm, maximale Transmission 50 %, Lichtflußrate  $4.4 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$ ) und 730 nm (12.9 nm, 45 %,  $0.2 \text{ W} \times \text{m}^{-2}$ )

#### Laserblitz-Apparatur

s. VOGEL (1983), MAURER (1987), MAURER et al. (1987 a,b) und 2.4.2.

#### Circular-Dichrograph

Jobin Yvon Auto-Dichrograph Mark V, Division d'Instruments S.A., Longjumeau, Frankreich, mit kommerziellem Kryostaten Variocryostat, Jobin Yvon, Thermostatisier-Einrichtung und 10 mm Messing-Küvetten mit Quarzfenstern

#### Elektrophorese-Apparatur

Vertikal-Elektrophoresekammer mit Wasserkühlung, Midget 2050, LKB, Gräfenfing, mit Netzgerät E 532, Bachhofer, Reutlingen

#### Mikroskope

- Phasenkontrast-Mikroskop Olympus EH, Tokyo, Japan
- Inversmikroskop Diavert, Leitz, Wetzlar, mit Objektiven Phaco 10/0.25 und Phaco 32/0.41 und Photographier-Aufsatz

## 2.2. ISOLIERUNG UND REINIGUNG VON NATIVEM PHYTOCHROM

Die Isolierung und Reinigung von nativem Hafer-Phytochrom erfolgte nach einem vereinfachten und standardisierten Verfahren, das eine Weiterentwicklung der Methoden von P.H. EILFELD (1984) bzw. THÜMLER et al. (1985) darstellt. Hierzu wurde natives Phytochrom wie bei VIERSTRA und QUAIL (1983a) beschrieben in der  $P_{fr}$ -Form aus etwa 72 Std. alten etiolierten Haferkeimlingen mit 100 mM Trispuffer extrahiert, der 50 % (v/v) *Ethylenglycol* und 4 mM *Phenylmethansulfonsäurefluorid* (PMSF) enthält. Nach einer *Polyethylenimin*-Fällung und anschließender Aufkonzentrierung mit Ammonsulfat wurde der so erhaltene Rohextrakt an käuflichem "fast-flow" *Hydroxylapatit* adsorbiert (vgl. DATTA und ROUX, 1985) und mit einem KPP-Gradienten (20 mM + 100 mM, pH 7.8) wieder eluiert. Mit Hilfe von 1.0 M *Ammonsulfat* ( $\approx 32\%$  Sättigung) wurde Phytochrom aus diesem Eluat ausgefällt und der erhaltene Niederschlag mit 0.5 ml 100 mM KPP pro mg Phytochrom gewaschen. Der nach diesem Schritt verbleibende Niederschlag wurde in 20 mM KPP, pH 7.8 (0.3-0.4 ml pro mg Phytochrom) wieder aufgenommen, wodurch Lösungen mit  $A_{667}(P_r) = 1.5-2.5$  und einem Reinheitsindex (= SAR, specific absorbance ratio =  $A_{667}(P_r) : A_{280}$ ) von  $> 0.6$  erhalten wurden. Ähnliche Methoden wurden zwischenzeitlich von verschiedenen Autoren publiziert (CHAI und SONG, 1986; GRIMM und RÜDIGER, 1986; CHAI et al., 1987), die sich im wesentlichen nur in den Mengen und individuellen Zusammensetzungen der verwendeten Puffer unterscheiden. Die so erhaltenen Phytochromlösungen wurden schließlich im Unterschied zu GRIMM und RÜDIGER (1986) an *Biogel A-1.5 m* chromatographiert (vgl.a. 3.1.2.), um sowohl niedermolekulare (z.B. Mercaptane) als auch höhermolekulare Verunreinigungen (Proteine mit Molekularmassen von 60 bzw. 160-200 kDa) quantitativ zu entfernen; die Elution erfolgte mit 20 mM KPP, pH 7.8. Dieser letzte Reinigungsschritt war von besonderer Bedeutung, da bei der Phytochrommodifizierung stets sichergestellt sein muß, daß keinerlei niedermolekulare organische Verunreinigungen mehr vorhanden sind, die die eigentlich gewünschten Umsetzungen in irgendeiner Weise stören könnten.

Die Konzentration der so erhaltenen Phytochromlösungen wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von  $132\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  (LAGARIAS et al., 1987) in der  $P_r$ -Form, dh. nach mindestens einminütiger Belichtung mit Dunkelrot ( $\geq 715\text{ nm}$ ), bei Raumtemperatur bestimmt. Der Rein-

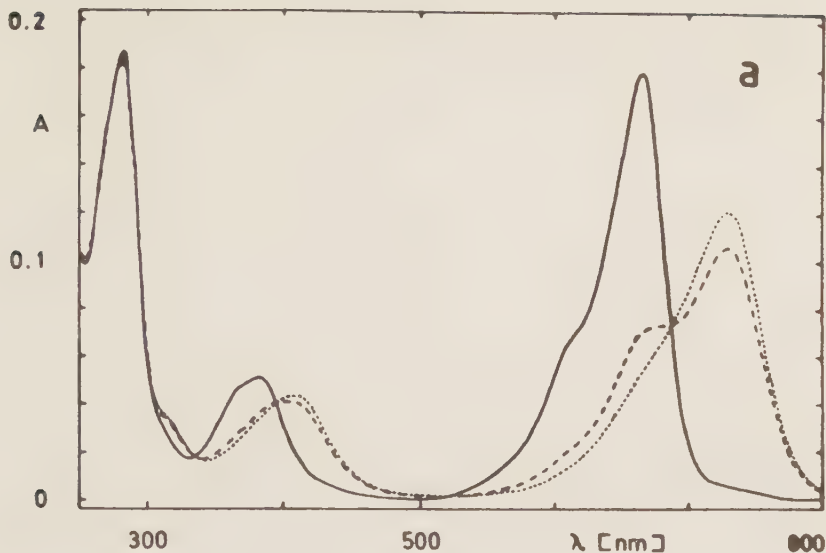
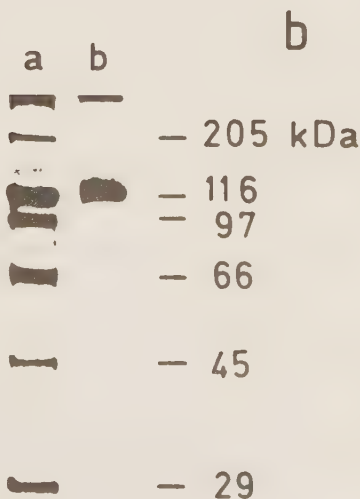


Fig. 1 :

Biogel-gereinigtes 124 kDa Phytochrom aus Hafer (*Avena sativa* L.); 2,5 Jahre bei  $-22^{\circ}\text{C}$  gelagert :

a) Absorptionsspektren in 20 mM KPP, pH 7.8:  $P_R$  (—),  $P_{fr}$  nach sättigender Belichtung von  $P_R$  im Photogleichgewicht mit 88%  $P_{fr}$ -Anteil (---) und berechnete Absorption von reinem  $P_{fr}$  (.....)

b) SDS-Gelchromatographie (9% Polyacrylamid, Silberfärbung): Eichproteine (Spur a) und 1  $\mu\text{g}$  124 kDa Phytochrom



heitsindex lag routinemäßig zwischen 0.90 und 0.96 (vgl. DATTA und ROUX, 1985: 0.92; LAGARIAS und MERCURIO, 1985: 0.95; VIERSTRA und QUAIL, 1983a: 0.96; CHAI et al., 1987: 1.13). Allgemein waren die spektralen Eigenschaften identisch mit den von VIERSTRA und QUAIL (1983a), CHAI und SONG (1986) bzw. CHAI et al. (1987) beschriebenen, dh. das Absorptionsverhältnis  $A_{730}(P_{fr}) : A_{667}(P_r)$  betrug 0.58, das Verhältnis  $\Delta A_{667} : \Delta A_{730}$  lag bei 1.00. Die Relation der beiden  $P_{fr}$ -Absorptionsbanden  $A_{730}(P_{fr}) : A_{673}(P_{fr})$ , die besonders empfindlich auf Veränderungen der Proteinstruktur wie Degradierung oder Denaturierung reagiert, betrug mindestens 1.41. Die Eigenschaften der auf diese Weise erhaltenen Phytochromlösungen zeigt z.B. Fig. 1.

Diese Lösungen konnten im selben Puffer unter Zusatz von 3-4% (v/v) *Glycerin* bei 250 K aufbewahrt werden, ohne daß ihre spektralen oder biochemischen Eigenschaften in irgendeiner Weise beeinträchtigt wurden, sofern das eingefrorene Material nicht öfter als einmal aufgetaut wurde (vgl. a. Fig. 1). SDS-Gelelektrophorese mit Hilfe von 7.5 oder 10% *Polyacrylamid*-Gelen nach der Methode von LAEMMLI (1970) ergab sowohl vor als auch nach Lagerung nur 1 Bande bei 124 kDa unter Verwendung von Konzentrationen von 0.2 mg pro ml.

Sofern nicht anders angegeben, wurden die so präparierten Phytochromlösungen frisch oder kurzzeitig gelagert (s.o.) für alle chemischen Umsetzungen bzw. biochemischen, spektroskopischen und molekularbiologischen Untersuchungen eingesetzt.

### 2.2.1. TRYPSIN-ABBAU VON NATIVEM PHYTOCHROM

Für einige Untersuchungen wurde proteolytisch abgebautes Phytochrom verwendet. Hierzu wurde 124 kDa Phytochrom nach vorheriger Belichtung zur  $P_{fr}$ -Form bei 298 K mit 1-1.5% *Trypsin* ( $w/w$ , bezogen auf die jeweilige Phytochrommenge) versetzt, um auf diese Weise abhängig von der Einwirkdauer entweder ein chromophorhaltiges 59 kDa Fragment (Incubation 2 Min.) oder ein 39 kDa Fragment (30 Min.) zu erhalten. Wie bei REIFF et al. (1985) beschrieben, konnte die Kinetik dieses Abbaus anhand der Absorptionsänderungen oberhalb von 500 nm verfolgt werden. Der tryptische Abbau wurde durch Zugabe von 4% *Trypsin-Inhibitor* ( $w/w$ , s.o.) abgestoppt (Incubation 15 Min. bei 298 K).

Die entstandenen Peptide wurden durch Gelfiltration an Biogel A-1.5 m bei einer Flußrate von jeweils 10 ml pro Stunde getrennt. Hierbei wurden Fraktionen von je 2.5 ml aufgefangen, die anschließend sowohl spektral als auch mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese untersucht wurden.

## 2.3. BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 2.3.1. DURCHGEFÜHRTE REAKTIONEN UND BESTIMMUNG DER ANZAHL MODIFIZIERTER AMINOSÄUREN

Um sicherzustellen, daß alle durchgeführten Reaktionen in der gewünschten Weise abliefen und auch keine unerwarteten oder unkontrollierbaren Nebenreaktionen auftraten, war es in jedem Fall erforderlich, die zur Modifizierung benötigten Stammlösungen frisch herzustellen, da praktisch alle eingesetzten Reagentien temperatur-, hydrolyse- und/oder oxidationsempfindlich waren. Die verwendeten Substanzen wurden dabei in der Regel in 100 mM KPP, pH 7.8 gelöst, das aufgrund des unpolaren Pyrenrestes ziemlich hydrophobe PMI wurde hingegen ebenso wie FDNB in reinem Ethylenglycol aufgenommen.

Aufgrund ihrer relativ geringen Reaktivität konnten 1,8-IAEDANS und FITC nicht in stöchiometrischen Mengen oder in nur geringem Überschuß eingesetzt werden. Um nun die Reaktion trotzdem zu einem definierten Zeitpunkt zu beenden und die Gefahr eines Ausbleichens der Phytochrom-Chromophorabsorption möglichst gering zu halten, mußte der Überschuß an nicht umgesetztem Reagens mit 14-30 mM 2-Mercaptoethanol abgefangen und anschließend durch Gelchromatographie oder Dialyse entfernt werden.

#### 2.3.1.1. 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS)

In Anlehnung an die Angaben von P.G. EILFELD und RÜDIGER (1984) wurde ANS vor der Verwendung jeweils dreimal aus gesättigter wässriger  $MgCl_2$ -Lösung umkristallisiert. Das gereinigte Reagens wurde in 100 mM KPP, pH 7.8 aufgenommen. Die so erhaltene Stammlösung wurde in Konzentrationen von 2-3.5 mM (bis 10 mM für Proben in Glycerinpuffer) mit etwa 0.5 µM Phyto-

chrom (in der  $P_{fr}$ -Form), gelöst in 20 mM KPP, pH 7.8 bzw. in 100 mM KPP, pH 7.8, verdünnt mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 66 % (v/v) umgesetzt, mindestens eine Stunde im Dunkeln bei 277 K incubiert und anschließend durch Dunkelrot-Belichtung in die  $P_{660}$ -Form überführt.

#### 2.3.1.2. Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB)

Die Modifizierung von nativem Phytochrom mit FDNB erfolgte jeweils durch Umsetzung mit einem großen Überschuß (dh. 0.2 - 1.0  $\mu$ M Phytochrom + 2.8 mM FDNB, gelöst in Ethylenglycol) bei 277 bzw. 298 K. Die Kinetik der Reaktion wurde dabei anhand der Extinktionszunahme bei 350 nm verfolgt ( $\epsilon = 16\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , MEANS und FEENY, 1971; GLAZER et al., 1982). Nicht gebundenes Reagens wurde durch Fällung des Phytochroms mit 42 % Ammonsulfat oder durch Gelchromatographie an Biogel A-1.5m entfernt.

#### 2.3.1.3. Quecksilberorganische Verbindungen

##### p-Chloromercuribenzoessäure (PCMB) und p-Chloromercuribenzolsulfonsäure (PMBS)

Pro mol Phytochrom wurden jeweils 1 - 25 mol des entsprechenden Mercuribenzolderivates eingesetzt, indem definierte Mengen einer geeigneten Stammlösung (0.16 mM PCMB bzw. 2.0 mM PMBS) zugegeben wurden. Beide Reagentien zeigten nach der Reaktion mit SH-Gruppen des Phytochrom-Proteins die gleiche molare Extinktionsänderung von  $7\,600\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  bei 250 nm (RIORDAN und VALLEE, 1972).

##### Fluoresceinquecksilberacetat (FMA)

Die Umsetzung mit FMA (Stammlösung 0.2 mM) erfolgte analog der Umsetzung mit PCMB bzw. PMBS, wobei allerdings die Absorptionsänderung bei 500 nm verfolgt wurde (molare Extinktionskoeffizienten:  $\epsilon_{498} = 78\,000$  für freies FMA,  $\epsilon_{510} = 47\,000$  für proteingebundenes FMA, vgl. HEITZ und ANDERSON, 1968). Hierbei ist jedoch zu beachten, daß überschüssiges FMA nicht-kovalent an Phytochrom bindet und auf diese Weise ähnliche spektrale Effekte hervorruft. Um nun den Anteil von kovalent gebundenem FMA zu ermitteln, wurden die Proben entweder gegen 20 mM KPP, pH 7.8 dialysiert (was allerdings aufgrund spektraler Änderungen des Fluorescein-Chromophors während der Dialyse nur Näherungswerte lieferte) oder an Biogel A-1.5m chromatographiert, was eine zuverlässige Bestimmung ermöglichte.

Die durch kovalente Bindung gebildeten Quecksilbersulfide konnten durch Zugabe von 20 mM *2-Mercaptoethanol* und anschließende Dialyse oder Gelchromatographie wieder gespalten werden. Die Spaltungsreaktion wurde anhand eines Extinktionsanstiegs und einer hypsochromen Verschiebung der Fluorescein-Absorption von 510 nach 502 nm verfolgt.

#### 2.3.1.4. *N*-(1-Pyrenyl)maleimid (PMI)

Auch die Umsetzung mit PMI erfolgte analog wie für PCMB und PMBS beschrieben (Stammlösung 0.2 mM), allerdings mußte dieses Reagens aufgrund des vergleichsweise hydrophoben Pyrenrestes in Ethylenglycol gelöst werden. Da PMI in gleicher Weise wie FMA auch nicht-kovalent an Phytochrom bindet, mußte auch hier überschüssiges Reagens durch Gelfiltration an Biogel A-1.5m oder durch Dialyse gegen 20 mM KPP entfernt werden. Daß die Trennung quantitativ erfolgte, war anhand von SDS-Gelelektrophorese zu erkennen, da nur die Bande bei 124 kDa die typische blaue Pyrenfluoreszenz zeigte. Die Menge von kovalent gebundenem PMI wurde mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von  $18\,000 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  bei 348 nm berechnet (CLARKE und MARTINEZ-CARRION, 1986; CANTOR und SCHIMMEL, 1980).

#### 2.3.1.5. *5,5'*-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) und *2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure* (NTCB)

Reaktionen mit DTNB wurden nach der Vorschrift von HERMANN und MÜLLER (1980) durchgeführt, Reaktionen mit NTCB in analoger Weise. Die Kinetik der Bildung des hierbei in beiden Fällen entstehenden Nitrothiophenolats-Ions konnte anhand der Extinktionsänderung bei 412 nm ( $\epsilon = 13\,600 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ) verfolgt werden. Für Umsetzungen bei Raumtemperatur (298 K) mußte allerdings aufgrund von Nebenreaktionen des Nitrophenolats (z.B. Reoxidation oder Hydrolyse, vgl. HERMANN und MÜLLER, 1980) auf den Zeitpunkt  $t=0$  extrapoliert werden.

#### Spaltung mit NTCB

Jeweils 50  $\mu\text{l}$  Phytochromlösung (ca 1 mg pro ml) wurden mit 30  $\mu\text{l}$  Spaltpuffer (200 mM Tris/HCl, 10 % SDS, pH 9.0) und 20  $\mu\text{l}$  10 mM NTCB vermischt, 30 Min. auf 75 °C erhitzt, dann mit 30  $\mu\text{l}$  SDS-Probenpuffer (vgl. LKB, 1986) erhitzt und schließlich auf 7.5 oder 15 % SDS-Gelen analysiert. Eine analoge Umsetzung ohne NTCB ergab weder Spaltung noch Degradierung.

#### 2.3.1.6. *Fluoresceinisothiocyanat* (FITC)

Diese klassische, bereits vor 1960 bekannte Substanz zur Fluoreszenzmarkierung (RINDERKNECHT, 1960; SINSHEIMER et al., 1974) mußte in relativ großem Überschuß (1–2 mM) eingesetzt werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 mM 2-Mercaptoethanol und anschließende Gelfiltration an Biogel A-1.5m bzw. Dialyse gegen 20 mM KPP, pH 7.8 abgestoppt. Der bis dahin erreichte Umsatz konnte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten von  $42\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  bei 495 nm (CANTOR und SCHIMMEL, 1980) berechnet werden.

#### 2.3.1.7. *N-Iodoacetyl-N'-(8-sulfo-1-naphthyl)ethyldiamin* (IAEDANS)

IAEDANS wurde ebenfalls in relativ großem Überschuß (bis zu 1 mM, Stammlösung 10 mM in 100 mM KPP, pH 7.8) zugegeben. Die Reaktion wurde zum gewünschten Zeitpunkt abgestoppt und nicht gebundenes Reagens entfernt wie für FITC beschrieben. Anhand des molaren Extinktionskoeffizienten von  $6\,800\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  bei 360 nm (CANTOR und SCHIMMEL, 1980) konnte die Anzahl gebundener Reste berechnet werden.

Die optimale Menge Reagens mußte in diesem Fall ziemlich genau eingehalten werden, da Konzentrationen über 3 mM – ähnlich wie für unsubstituiertes ANS beschrieben (P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1984) – zu einem Ausbleichen der Phytochromabsorption führten, hervorgerufen durch die Einlagerung des aromatischen Systems.

### 2.3.2. TRYPSIN-ABBAU

#### 2.3.2.1. FMA-modifiziertes Phytochrom

Jeweils 15–20 µM Phytochrom wurden mit definierten Mengen FMA versetzt und anschließend 45 Min. ( $P_r$ ) bzw. 15 Min. ( $P_{fr}$ ) bei 298 K incubiert. Das so behandelte Material wurde wie für unmodifiziertes Phytochrom beschrieben (vgl. 2.2.1.) bei 298 K mit 1% ( $w/w$ ) Trypsin abgebaut. Die gebildeten Peptide wurden an Biogel A-1.5m chromatographiert und sowohl spektral als auch mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese charakterisiert.

### 2.3.2.2. 1,8-IAEDANS- und FITC-modifiziertes Phytochrom

Hier wurde analog vorgegangen wie für FMA beschrieben, allerdings mußten in diesem Fall höhere Konzentrationen der Modifizierungsreagentien (2 mM) eingesetzt werden. Die Reaktion wurde jeweils durch Zugabe von 14 mM *2-Mercaptoethanol* und anschließende Incubation für 15 Min. bei 298 K abgestoppt. Der Trypsin-Abbau wurde in gleicher Weise wie bei unmodifiziertem bzw. FMA-modifiziertem Material durchgeführt.

Darüber hinaus wurden alle erhaltenen Fraktionen in Hinblick auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht, wobei die Anregung bei 365 nm (IAEDANS) bzw. bei 480 nm (FITC), die Detektion entsprechend bei 480 nm bzw. bei 512 nm erfolgte.

### 2.3.3. SDS-GELELEKTROPHORESE

Nach der von LAEMMLI (1970) beschriebenen Methode wurde die Elektrophorese aller eingesetzten Proben mit Hilfe von 7.5 oder 10 %igen Polyacrylamidgelen durchgeführt (vgl.a. LKB, 1986). Die Anfärbung der Gele erfolgte entweder mit *Coomassie Brilliant Blue R* (Die Methode wurde 1967 von CHRAMBACH et al. beschrieben und 1977 von SEDMARK et al. weiterentwickelt.) oder mit Hilfe des von MERRIL et al. (1983) veröffentlichten *Silber-Fluorverfahrens*.

Fluoreszenzmarkierte Banden wurden mit einer Quecksilberdampf Lampe mit vorgesetzten Interferenzfiltern (313 bzw. 365 nm) oder durch Anregung auf einer Leuchtplatte bei einer Wellenlänge von 302 nm sichtbar gemacht. Mit Hilfe dieser Anordnung konnten die entsprechenden Gele auch fotografiert werden.

## 2.4. BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN

### 2.4.1. TIEFTEMPERATUR-ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Für alle Tieftemperatur-Absorptionsspektren wurde Phytochrom verwendet, das wie unter 2.2. beschrieben präpariert und gegebenenfalls entsprechend

modifiziert worden war (vgl. 2.3.1.). Aus diesen Lösungen wurde Phytochrom mit 45 % Ammonsulfat ausgefällt und der Niederschlag entweder mit 100 mM KPP, pH (277 K) 7.8 aufgenommen und mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 66 % verdünnt oder direkt in 66 % Glycerinpuffer gelöst. Die Phytochromkonzentration der so erhaltenen Lösungen lag bei 2.5 - 3.0  $\mu\text{M}$ . Das Absorptionsverhältnis  $A_{730}(P_{fr}) : A_{667}(P_r)$  betrug unter diesen Bedingungen 0.63, das Verhältnis der beiden  $P_{fr}$ -Absorptionsbanden  $A_{731}(P_{fr}) : A_{670}(P_{fr})$  lag bei 1.55. Die verwendeten Lösungen besaßen einen Reinheitsindex (SAR) zwischen 0.5 und 0.95, wobei keinerlei kinetische Unterschiede zwischen Proben unterschiedlicher Reinheit gefunden wurden. Sowohl vor als auch nach Lagerung bei 77 K zeigte sich auf SDS-Gelen nur 1 Bande (bei weniger reinen Proben eine Hauptbande) bei 124 kDa.

#### 2.4.1.1. Deuterierung

Zur Deuterierung wurde natives Phytochrom mit Ammonsulfat ausgefällt, der Niederschlag in 100 mM KPP-D, pD (277 K) 7.8, 99.8 Atomprozent D, aufgenommen und mit  $(OD)_3$ -Glycerin (> 98 % D) bis zu einer Endkonzentration von 66 % ( $V/V$ ) verdünnt. Um einen vollständigen H-D-Austausch zu gewährleisten, wurden die Proben anschließend mindestens drei Belichtungszyklen unterworfen und 6 Std. bei 298 K incubiert (vgl. SARKAR und SONG, 1981; MOON et al., 1984, 1985).

Die Qualität der Probe wurde vor und nach der Deuterierung sowie nach Abschluß der kinetischen Messungen sowohl spektral als auch mit Hilfe von SDS-Gelelektrophorese überprüft. Hierbei wurde jeweils nur eine Bande bei 124 kDa gefunden, das Absorptionsverhältnis  $A_{729}(P_{fr}) : A_{664}(P_r)$  betrug 0.64, das Verhältnis der  $P_{fr}$ -Banden  $A_{729}(P_{fr}) : A_{670}(P_{fr})$  mindestens 1.52.

Zur Kontrolle wurde jeweils ein nicht deuteriertes Aliquot derselben Phytochrompräparation behandelt wie oben beschrieben und für analoge kinetische Messungen verwendet.

#### 2.4.1.2. Absorptionsspektren

Alle Absorptionsspektren wurden mit Hilfe eines Zweiwellenlängen-Spektralphotometers im Zweistrahlbetrieb mit einer Genauigkeit von etwa 0.001 Extinktionseinheiten aufgenommen. Für die Tieftemperaturmessungen wurden

Plastik-Küvetten verwendet und mit aus flüssigem Stickstoff entwickelten N<sub>2</sub>-Gas gekühlt, wobei die Temperaturen während der Messung jeweils auf  $\pm 1$  K konstant gehalten werden konnten. Bei langsamer und vorsichtiger Abkühlung entstanden so klare und luftblasenfreie Gläser ohne Sprünge oder andere Inhomogenitäten.

Die Belichtung der Proben erfolgte von oben aus einer Entfernung von etwa 40 mm mit Hilfe einer Glasfaseroptik, wobei die Probe homogen ausgeleuchtet wurde. Um den Zeitpunkt der Belichtung mit einer Genauigkeit von mindestens 0.5 s bestimmen zu können, wurde das Umwandlungslicht gemeinsam mit der zugehörigen Kinetik mit Hilfe eines an das Photometer angeschlossenen Digitalplotters registriert. Für Tieftemperatur- und Raumtemperaturspektren wurde jeweils die gleiche Meßanordnung und die gleiche Probe verwendet, um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten.

#### 2.4.1.3. Bestimmung der Quantenausbeuten

Die Quantenausbeute der Photokonversion von P<sub>r</sub> zu P<sub>fr</sub> wurde mit Hilfe von Gleichung (d) aus der Arbeit von BUTLER (1972) anhand semilogarithmischer Kinetiken berechnet. Die Quantenausbeute der Photokonversion von P<sub>r</sub> zu lumi-R ( $\phi_r^\lambda$ ) mit Anregungslicht der Wellenlänge  $\lambda$  wurde nach der Methode von BUTLER (1972) bzw. HARTMANN und HAUPT (1982) aus der *Anfangssteigung* der entsprechenden Kinetik erhalten. Allgemein wurden hierbei die für P<sub>fr</sub> gültigen Parameter durch die entsprechenden Werte für lumi-R ersetzt, so daß sich aus BUTLER's Gleichung der Ausdruck (I) ergab :

$$(I) \quad \phi_r^\lambda = \left. \frac{d A_{694}}{dt} \right|_{t=0} \times \frac{6.023 \times 10^{23}}{2.30 A_\lambda(P_r) \Delta \epsilon I_\lambda}$$

Hierbei charakterisiert  $d A_{694}/dt$  die Bildung von lumi-R nach einer Belichtungszeit von dt Sekunden, ausgehend von reinem P<sub>r</sub>.  $A_\lambda(P_r)$  bezeichnet die P<sub>r</sub>-Absorption zum Zeitpunkt  $t=0$  bei der Wellenlänge  $\lambda$ ,  $\Delta \epsilon$  die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten lumi-R minus P<sub>r</sub> bei 694 nm und  $I_\lambda$  den Photonenfluß des Anregungslichtes bei der Wellenlänge  $\lambda$  in Quanten $\times$ cm<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.

Ebenso ist es möglich, die Quantenausbeute zu berechnen, wenn man von der Situation im *Photogleichgewicht* nach sättigender Belichtung ausgeht. Modifiziert man nämlich Gleichung (b) aus BUTLER (1972) zu (II), so erhält man

die Quantenausbeute der Rückreaktion  $\phi_1^\lambda$ .  $P_r(\infty)$  und lumi-R ( $\infty$ ) stellen hierbei die jeweiligen Konzentrationen im Photogleichgewicht dar:

$$(II) \quad \phi_1^\lambda = \phi_r^\lambda \times \frac{\epsilon_\lambda(P_r) [P_r(\infty)]}{\epsilon_\lambda(\text{lumi-R}) [\text{lumi-R}(\infty)]}$$

Ersetzt man andererseits in Gleichung (I)  $A(P_r)$  durch  $A(\text{lumi-R})$ , erhält man ebenfalls die Quantenausbeute der Rückreaktion  $\phi_1^\lambda$  bei Belichtung mit 698 nm, in diesem Fall allerdings aus der *Anfangssteigung* der Photokonversionskinetik. Im Idealfall sollten beide Werte identisch sein, was jedoch hier aufgrund eines nur mangelhaft eingestellten Photogleichgewichtes nicht erreicht werden konnte.

Um den von YAMAMOTO und SMITH (1981) geforderten Bedingungen zu genügen, wurde die Phototransformationsrate bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 661 nm bzw. 698 nm bestimmt. Dabei gilt Gleichung (I) im untersuchten Temperaturbereich ohne Einschränkung, da außer lumi-R kein weiteres Photoprodukt des Primärprozesses gefunden wurde (PRATT und BUTLER, 1968; P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985). Mit Hilfe der bekannten molaren Extinktionskoeffizienten (P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985) konnte die jeweilige Menge des gebildeten Photoproduktes bestimmt werden, wobei auch die Temperaturabhängigkeit des  $P_r$ -Spektrums (THÜMLER und RÜDIGER, 1984) berücksichtigt werden mußte (Die Temperaturabhängigkeit des lumi-R-Spektrums ist nur wenig höher als die des  $P_r$ -Spektrums; P.G. EILFELD, P.H. EILFELD, F.-W. DEEG, unveröffentlicht.).

Aufgrund der Geometrie der Meßanordnung (Länge des effektiven Lichtweges, Reflexion) war es notwendig, die Intensität des Anregungslichtes zu bestimmen. Zu diesem Zweck wurde Phytochrom selbst als *actinometrische Eichsubstanz* verwendet, wobei von einer Quantenausbeute  $\phi(P_r + P_{fr}) = 0.152$  bei 277 K und einem  $P_{fr}$ -Anteil von 87 % (KELLY und LAGARIAS, 1985) ausgegangen wurde. Diese Kontrollmessungen wurden bei 290 K durchgeführt und nach der Methode von BUTLER (1972) analysiert. Die semilogarithmische Darstellung nach BUTLER (entspricht Gleichung 7 in HERMANN et al., 1985) ergab eine nahezu perfekte Gerade; die von GARDNER und BRIGGS (1974) beobachteten Abweichungen für höhere Konzentrationen traten nicht auf. Die so erhaltenen Werte für den Photonenfluß ( $I_{661} = 30 \times 10^{18}$  Quanten  $m^{-2}s^{-1}$ ,  $I_{698} = 22 \times 10^{18}$  Quanten  $m^{-2}s^{-1}$ ) konnten zur Berechnung der Quantenausbeuten eingesetzt werden.

#### 2.4.1.4. Kinetische Analyse

Alle erhaltenen Photokonversionskinetiken wurden einer graphisch-mathematischen "*Peeling-Analyse*" nach van LIEW (1967) unterzogen. Dieses Verfahren stellt die aus der semilogarithmischen Auftragung der Meßwerte erhaltene Ausgleichsgerade als Summe von Exponentialfunktionen dar, wobei der Endwert der Kinetik in der Regel graphisch ermittelt wird. Anschaulich betrachtet geben die in dieser Darstellung als Geraden erscheinenden Exponentialfunktionen die Teilprozesse der beobachteten Gesamtreaktion wieder.

#### 2.4.2. LASERBLITZ-ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Die Phytochromlösungen für alle Laserblitz-Experimente wurden wie unter 2.2. angeführt präpariert und gegebenenfalls wie beschrieben modifiziert. Falls eine Erhöhung der Phytochromkonzentration erforderlich war, wurde eine Ammonsulfatfällung durchgeführt, der Niederschlag in 20 mM KPP, pH 7.8 (bei 277 K) aufgenommen und mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 3-66 % (V/V) verdünnt. Das Maximum der  $P_r$ -Absorption der verwendeten Lösungen lag zwischen 0.5 und 1.5 bei 667 nm.

##### 2.4.2.1. Laserblitz-Photolyse

Für alle kinetischen Untersuchungen der Phototransformation von  $P_r$  zu  $P_{fr}$  wurde die bei VOGEL (1981), VOGEL et al. (1983) und MAURER (1987) beschriebene Apparatur eingesetzt, die allerdings folgendermaßen abgewandelt werden mußte (vgl.a. Fig. 2):

Der  $N_2$ -Laser wurde durch einen Excimer-gepumpten Farbstofflaser ersetzt, der Lichtpulse mit einer Energie von etwa 1 mJ bei einer Dauer von 10 ns lieferte. Das Meßlicht wurde von einem Gittermonochromator erhalten, wobei die Spaltweite des Meßlichts 0.05-0.2 mm betrug, was einer Lichtintensität von etwa  $1 \mu W \times cm^{-2}$  entspricht. Aus diesem Grund konnten meßlichtinduzierte Photokonversionseffekte bei Meßzeiten unter 10 s vollständig vernachlässigt werden. Hinter der Küvette passierte das Meßlicht einen zweiten Gittermonochromator mit direkt aufgesetztem Photomultiplier. Durch die Verwendung von zwei Monochromatoren konnte die spektrale Reinheit des Meßlichtes deutlich erhöht werden. Die Signale des Photomultipliers wurden

digitalisiert und weiterverarbeitet wie bei MAURER (1987) beschrieben. Eine eventuelle Photoreversion der Intermediate konnte aufgrund ihrer sehr kurzen Halblebensdauer vernachlässigt werden (RUZSICKA et al., 1985; SCHEUERLEIN et al., 1986).

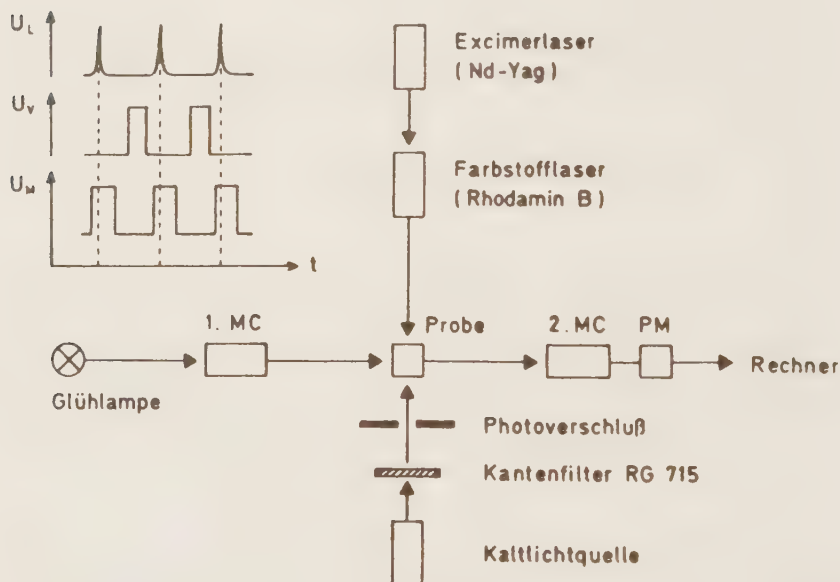


Fig. 2 : Schematischer Aufbau der Apparatur für Laserblitz-Photolyse und schnelle kinetische Messungen; MC = Monochromator, PM = Photomultiplier

Die Randfigur oben links zeigt den zeitlichen Ablauf der Messungen:  $U_L$  = Laseranregungslicht (nicht maßstabsgerecht, Dauer 10 ns),  $U_V$  = Rückbelichtung, dh. Öffnung des Photoverschlusses,  $U_M$  = Meßintervall; somit ergibt sich folgender Gesamtverlauf: Die kinetische Messung beginnt bei geschlossenem Photoverschluß; nach sehr kurzer Zeit erfolgt Laseranregung und Messung des zeitabhängigen Signals. Danach öffnet sich der Photoverschluß, die Probe wird bis zum Beginn der nächsten Messung vollständig in die  $P_r$ -Form zurückbelichtet. Ein vollständiger Meßzyklus umfaßt 20 s.

Während der Messungen wurde die Temperatur der Proben mit Hilfe einer thermostatisierten Wasserkühlung auf  $298 \pm 1$  K konstant gehalten. Vor jeder erneuten Laserblitz-Anregung wurden die Phytochromproben wieder mit dunkelrotem Licht ( $> 715$  nm) quantitativ in die  $P_r$ -Form überführt. Für ein gegebenes Meßintervall wurden die Absorptionsänderungen aus 16-32 (für Wellenlängen über 600 nm) bzw. aus 128 (für Wellenlängen um 500 nm) Meßreihen gemittelt. Die Rauschintensität konnte so auf unter 0.0005 Extinktionseinheiten bei einer Absorption von 1.0 reduziert werden (vgl. Fig. 21). Die Intervalle zwischen den einzelnen Meßreihen wurden von 5 ms bis 100 ns variiert (5 ms - 1 ms - 200  $\mu$ s - 50  $\mu$ s - 2  $\mu$ s - 500 ns - 100 ns).

#### 2.4.2.2. Kinetische Analyse

Die erhaltenen kinetischen Daten wurden mit Hilfe eines *multi-exponentialen Verfahrens* zur Bestimmung von Ausgleichskurven analysiert (MAURER, 1983, 1987; MAURER, 1987 a,b), das von Gleichung (III) Gebrauch macht (entnommen aus RUZSICKA et al., 1985):

$$(III) \quad \Delta A(\lambda_j, t) = \sum_{i=1}^n b_i(\lambda_j) e^{-k_i \times t}$$

Hierbei ist  $\Delta A(\lambda_j, t)$  die bei der Wellenlänge  $\lambda_j$  zum Zeitpunkt  $t$  gemessene Absorptionsänderung und  $b_i(\lambda_j)$  die für die betreffende Wellenlänge mit Hilfe der ermittelten Geschwindigkeitskonstanten berechnete Amplitude. Weitere Einzelheiten zu dem angewandten mathematischen Analyseverfahren sind MAURER (1983, 1987 a,b) zu entnehmen.

Analog zu gängigen mathematischen Reihenentwicklungen wurde somit der zeitliche Verlauf der Extinktionsänderungen (im Gegensatz zur van LIEW-Methode, vgl. 2.4.1.4.) *direkt*, dh. ohne vorhergehende Linearisierung, durch eine Summe von Exponentialfunktionen angenähert. Die hierbei auftretenden (zunächst formalen) Exponenten erhalten durch die Theorie der Reaktionsmechanismen (LAIDLER, 1970) unmittelbar anschauliche Bedeutung als Halblebensdauer von Intermediaten, wobei hierfür allerdings entsprechende (vereinfachende) Modelle über den Reaktionsablauf zugrundegelegt werden müssen.

Die Extinktionsänderungen bei verschiedenen Wellenlängen konnten nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate nicht-linear angepaßt werden, um so

die Geschwindigkeitskonstanten und die präexponentiellen Faktoren (die anschaulich der Amplitude, dh. den Extinktionsänderungen, des jeweiligen Prozesses entsprechen) zu erhalten. Hierbei wurde vorausgesetzt, daß sich ein gegebenes Intermediat im absorbierten Spektralbereich bei verschiedenen Wellenlängen über die Meßzeit hinweg einheitlich verhielt (PARODI et al., 1984). Zur Dokumentation und Auswertung der auftretenden Absorptionsänderungen wurde eine *logarithmische Zeitskala* gewählt, um einerseits die um Größenordnungen differierenden Konstanten angemessen darstellen zu können und andererseits die Rechenzeit bzw. den benötigten Speicherplatz möglichst gering zu halten. In jedem Fall ergaben sowohl die Ausgleichskurven für einzelne Wellenlängen als auch die für alle Wellenlängen gemeinsam übereinstimmende Resultate.

Die von van LIEW (1967) vorgeschlagene "Peeling-Methode" lieferte hier im allgemeinen ungenügende Ergebnisse, da die hierzu erforderliche Logarithmierung unvertretbar hohe Streuungen im Bereich des Endwertes bewirkte. Dieses Verfahren wurde deshalb nur zur groben Abschätzung von Näherungswerten als Ausgangspunkt für die oben beschriebene Anpassungsprozedur herangezogen.

#### 2.4.3. CIRCULAR-DICHROISMUS

Der Circular-Dichroismus von unmodifiziertem und FMA-modifiziertem 124 kDa Phytochrom (2.3.1.3.) wurde in 66% Glycerinpuffer, pH 7.8 bei verschiedenen Temperaturen vor und nach Belichtung gemessen. Hierbei wurden jeweils auch die zugehörigen *Transmissionspektren* aufgenommen, die die Berechnung der entsprechenden Absorptionsspektren erlaubten. Auf diese Weise konnte anhand der von P.G. EILFELD und RÜDIGER (1985) bestimmten Extinktionskoeffizienten die Menge der jeweils gebildeten Intermediate und hieraus wiederum die CD-Spektren der reinen Intermediate berechnet werden.

### 2.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

#### 2.5.1. ISOLIERUNG VON ZELLKERNEN AUS ETIOLIERTEN HAFERKEIMLINGEN

Eine für die Isolierung von Roggenzellkernen entwickelte und bereits mehrfach erprobte Methode (ERNST und OESTERHELT, 1984) erwies sich zur Isolierung

rung von Haferzellkernen als vollkommen ungeeignet, da diese entweder irreversibel komplexe Aggregate bildeten oder bei der Reinigung lysierten. Aus diesem Grund mußte ein neues Extraktionsverfahren entwickelt werden, das auf Angaben von MÖSINGER und SCHÄFER (1984) zurückgreift.

Die für alle beschriebenen Versuche verwendeten Zellkerne wurden aus 50 bis 110 Stunden alten etiolierten Haferkeimlingen bei 277 K unter grünem Sicherheitslicht isoliert. Dabei wurden die (gegebenenfalls nach Bedarf vorbelichteten) Keimlinge (Mindestmenge 1 g) 10 Min. zunächst in absolutem *Diethylether* (5 ml pro g Frischgewicht), anschließend dreimal in der gleichen Menge Extraktionspuffer (0.4 M *Sucrose*, 25 mM MES, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM *2-Mercaptoethanol* oder *Ascorbat*, pH 6.0 bei 277 K) geschüttelt. Nach Überführung in die halbe Menge Waschpuffer I (2.5 % w/w *Ficoll* F-400, 5.0 % w/w *Dextran* 40 000, 2 mM *Spermin*, 0.5 % v/v *Triton* X-100, in Extraktionspuffer) wurden die Keimlinge 10 s bei maximaler Umdrehung in einem 100 ml-Mixbecher (Waring blender) homogenisiert und der Extrakt anschließend über zwei Lagen Nylongittergewebe filtriert. Das Filtrat wurde 6 Min. bei 75 % der Maximalumdrehung (Zentrifuge: Hettich; entspricht etwa 2000 g) zentrifugiert, der Niederschlag in Waschpuffer I (0.4 ml pro g Frischgewicht) aufgenommen und der Überstand nach mikroskopischer Kontrolle verworfen. Die so erhaltene Suspension wurde auf einem *Percoll*-Stufengradienten (gesättigte Sucroselösung - 80 % *Percoll* - 60 % *Percoll* - 40 % *Percoll*) 30 - 40 Min. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert. Die Kernfraktion (Grenzschicht *Sucrose* - 80 % *Percoll*) wurde abpipettiert, 1:1 mit Waschpuffer I verdünnt und nach mikroskopischer Kontrolle folgenden weiteren Waschoperationen unterworfen, wobei zwischen den einzelnen Schritten jeweils 5 Min. bei 50 % der Maximalumdrehung zentrifugiert wurde:

- Resuspension in Waschpuffer I (1 ml pro g Frischgewicht)
- Resuspension in derselben Menge Waschpuffer I, 1:1 verdünnt mit Waschpuffer II (wie Waschpuffer I, jedoch ohne *Spermin* und *Triton* X-100)
- Resuspension in derselben Menge Waschpuffer II

Die so erhaltenen  $\geq 90$  % reinen Kernfraktionen (vgl. Fig. 24 a) wurden in einer Thomakammer ausgezählt, je nach Kerndichte in 0.5 - 1.5 ml Lagerungspuffer (0.4 M *Sucrose*, 50 mM MES, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM *2-Mercaptoethanol* oder *Ascorbat*, 20 % v/v *Glycerin*, pH 6.0) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 77 K eingefroren. Bei allen durchgeführten Versuchen konnten keinerlei Unterschiede zwischen frisch präparierten und längere Zeit eingefrorenen Kernfraktionen festgestellt werden.

## 2.5.2. NACHWEIS VON PHYTOCHROM AN ZELLKERNEN DURCH ELISA

Der Phytochrom-Nachweis durch ELISA erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von SCHWARZ und SCHNEIDER (1987). Hierzu wurden die wie unter 2.5.1. beschrieben präparierten Zellkernfraktionen nach mikroskopischer Kontrolle 1:1 mit Waschpuffer I verdünnt, um die Viskosität der Suspension zu erniedrigen. Pro Ansatz wurden ca 1-5 Millionen Zellkerne verwendet, als Blindprobe diente Waschpuffer I: Lagerungspuffer (1:1) sowie ein jeweils un zentrifugierter Ansatz. Die Zellkerne wurden zunächst 5 Min. bei maximaler Umdrehung zentrifugiert (Mikroliterzentrifuge) und anschließend mit folgenden Lösungen incubiert, wobei dieser Zentrifugationsschritt nach jedem Wechsel der Lösung wiederholt wurde:

- Zugabe von 100  $\mu$ l monoclonalen anti-Phytochrom-Antikörpern (aus *Maus*, 1:1000) bzw. polyclonalen anti-Phytochrom-Antikörpern (aus *Kaninchen*, 1:1000), Incubation mindestens 24 Std. bei 277 K
- Zugabe von 100  $\mu$ l polyclonalen anti-Maus-Antikörpern (aus *Kaninchen*, 1:200, mit Peroxidase oder FITC konjugiert, Sigma A 5906) bzw. polyclonalen anti-Kaninchen-Antikörpern (aus *Ziege*, 1:200, mit Peroxidase konjugiert, Sigma A 6154), Incubation 3 Std. bei Raumtemperatur
- bei Peroxidase-Markierung: Zugabe von 100  $\mu$ l Substratlösung (2 mg pro ml ABTS oder OPDA in 0.1 mM  $K_2HPO_4$ , 0.1 mM Kaliumcitrat, 0.1 % ( $V/V$ )  $H_2O_2$ , pH 5.0), Incubation mindestens 10 Min.

Das Lösungsmittel war in allen Fällen 150 mM NaCl in 20 mM KPP, pH (277 K)

7.4. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte jeweils anhand der Absorption bei 430 nm nach 30 Minuten.

Um die Aktivität der verwendeten Antikörper sowie die Abhängigkeit der gemessenen Absorption von der eingesetzten Phytochrommenge genauer bestimmen zu können, wurde jede Meßreihe mit einem *Kontrollansatz* auf Mikrotiterplatten verglichen. Hierzu wurden die Platten zunächst mindestens 24 Std. bei 277 K mit Phytochrom bekannter Konzentration incubiert und die danach noch freien Bindungsstellen mit *Rinderserumalbumin* abgedeckt (Incubation 2-3 Std. bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die gleichen Antikörper erster und zweiter Ordnung verwendet wie oben beschrieben. Für die Eichwerte ergaben sich hierbei ähnliche sigmoide Kurven wie von SCHWARZ und SCHNEIDER (1987) angegeben, die eine graphische Interpolation unbekannter Konzentrationen ermöglichten.

### 2.5.3. BINDUNG VON MODIFIZIERTEM PHYTOCHROM AN ZELLKERNE

Aus etiolierten Haferkeimlingen wurden Zellkerne isoliert (2.5.1.), wobei allerdings dem Extraktionspuffer zuvor 1,8-IAEDANS-markiertes Phytochrom (vgl. 2.3.1.7., 50 µg pro g Frischgewicht) zugesetzt worden war. Die weitere Reinigung erfolgte bis zum Percoll-Gradienten wie beschrieben (2.5.1.). Anschließend wurden die Zellkerne in SDS-Probenpuffer (nach LKB, 1986) aufgelöst und auf 10 % SDS-Gelen chromatographiert.

### 2.5.4. GENREGULATION

Eine Million abzentrifugierter Roggenzellkerne (präpariert nach ERNST und OESTERHELT, 1984) wurden in 100 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM Dithioerythritol, 12.5 % <sup>v/v</sup> Glycerin, pH 8.5) aufgenommen und mit 12 µg Phytochrom (unmodifiziert oder FMA-modifiziert) bzw. als Kontrolle mit der entsprechenden Menge 20 mM KPP, pH 7.8, verdünnt mit 3.3 % (<sup>v/v</sup>) Glycerin 5 Min. bei 273 K incubiert. Nach Zugabe von 10 µl <sup>32</sup>P-UTP (40 µCi pro 10 µl), 30 µl Incubationspuffer (100 mM KCl, 50 mM Ammonsulfat, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, je 0.5 mM ATP, GTP und CTP) und 1 µl RNAasin wurde für 30 Min. bei 298 K im Dunkeln incubiert. Je 3 µl dieser Mischung wurden auf DE 81-Papier aufgetragen und wie folgt gewaschen:

- 6 mal mit 0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Incubation 5 Min.

- 2 mal mit H<sub>2</sub>O, dann 2 mal mit 96 % Ethanol, Incubation je 1 Min.

Die Menge des eingebauten UTP wurde anhand der Intensität der radioaktiven Strahlung im Scintillationszähler bestimmt.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. BIOCHEMIE MODIFIZIERTER PHYTOCHROME

Als Grundlage für weitergehende Untersuchungen sollen im ersten Teil dieser Arbeit zunächst Methoden vorgestellt werden, die es ermöglichen, selektive chemische Modifizierungen durchzuführen, die Position der modifizierten Reste zu bestimmen und Auswirkungen auf den Mechanismus der Photokonversion zu betrachten.

##### 3.1.1. NICHT-KOVALENTE MODIFIZIERUNG

Bevor nun gezielte Modifizierungen in Angriff genommen werden konnten, war es notwendig, zunächst grundlegende Informationen über die Stabilität des untersuchten Systems zu erhalten. So flockte das Protein z.B. unterhalb von pH 6,8 deutlich aus. Andererseits ist 124 kDa Phytochrom im Gegensatz zu degradierten Species ein bemerkenswert stabiles Proteid (vgl. Tab. 1). So gelang es nicht, mit Polyhydroxy-Verbindungen (*Ficoll*) die Tertiärstruktur nennenswert zu beeinflussen (zumindest nicht in Chromophornähe, da *Ficoll* aufgrund seiner Größe wohl gar nicht in diesen Bereich gelangen kann). Die Tetrapyrrolabsorption wurde hierbei als Indikator für Störungen betrachtet. In geringem Maße war eine Beeinflussung jedoch mit Detergentien wie *Triton X-100* möglich, allerdings erst nach relativ langer Incubationszeit. Da *Triton X-100* ebenso wie *8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure* (ANS) vor allem hydrophobe Wechselwirkungen unterbindet, deutet dies darauf hin, daß Phytochrom zu einem nicht unbeträchtlichen Anteil durch stark hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird.

##### 3.1.2. KOVALENTE MODIFIZIERUNG DES APOPROTEINS

Für gezielte chemische Modifizierungen wäre im Idealfall ein Protein in einem quasi-inerten Lösungsmittel erforderlich. Diesem Ideal konnte durch die Verwendung von niedermolaren Kaliumphosphat-Puffern (20 mM KPP, pH 7,8) ohne weitere Zusätze sehr nahe gekommen werden. Weiterhin war zu

beachten, daß aus demselben Grund für den letzten Reinigungsschritt, die Biogel-Chromatographie (2.2.), 2-Mercaptoethanol-freie Puffer verwendet werden mußten, zumal Mercaptoethanol nicht nur eine signifikante Eigenabsorption unterhalb 260 nm besitzt, sondern auch selbst zahlreiche Reaktionen eingehen kann (z.B. mit quecksilberorganischen Verbindungen). Ähnliches gilt selbstverständlich auch für andere Oxidationshemmer wie *Ascorbat*, *Dithioerythrol* oder *Thioethylenglycol*.

Wie aus der Literatur bekannt ist (SARKAR und SONG, 1982) und durch eigene Untersuchungen vielfach bestätigt werden konnte, geht Phytochrom auch sehr stabile Bindungen mit (polycyclischen) aromatischen Systemen ein, so z.B. mit den in pflanzlichen Rohextrakten häufigen *Ligninen*, *Tanninen* und *Flavinen*, was zu zahlreichen Artefakten bei darauffolgenden Modifizierungsexperimenten führen würde. Außerdem ergaben neuere *in vitro*-Untersuchungen eine außerordentlich hohe Affinität zu polyphenolhaltigen Calcium-Vesikeln aus *Mougeotia* (WAGNER und P.G. EILFELD, unveröffentlicht), was auf eine grundsätzliche Tendenz zur Assoziation an Polyphenole hinweist.

TAB. 1 : SPEKTRALEIGENSCHAFTEN NICHT-KOVALENT MODIFIZIERTER PHYTOCHROME

| Bedingungen <sup>a)</sup>        | $\lambda_{\max}$ in nm |          | $A_{730} (P_{fr})$ | $A_{730} (P_{fr})$ |
|----------------------------------|------------------------|----------|--------------------|--------------------|
|                                  | $P_r$                  | $P_{fr}$ | $A_{667} (P_r)$    | $A_{673} (P_{fr})$ |
| KPP, pH 7,8                      | 667                    | 730      | 0.60               | 1.41               |
| 50 % Ethylenglycol               | 667                    | 731      | 0.60               | 1.50 <sup>b)</sup> |
| 66 % Glycerin                    | 667                    | 732      | > 0.68             | 1.55 <sup>b)</sup> |
| 33 % Ficoll                      | 666                    | 729      | 0.58               | 1.44               |
| 66 % (OD) <sub>3</sub> -Glycerin | 664                    | 729      | 0.64               | 1.52               |
| 1 % Triton X-100 <sup>c)</sup>   | 660                    | 720      | 0.42               | 1.00               |

<sup>a)</sup> nach 24 Std. Incubation bei 277 K; angegeben in der Reihenfolge zunehmender Beeinflussung; <sup>b)</sup> nur Schulter bei 673 nm, kein definiertes Maximum; <sup>c)</sup> nach 1 Std. bei 298 K noch keinerlei Effekte sichtbar

Das nach dieser unter 2.2. ausführlich dargestellten Methode erhaltene Phytochrom erwies sich als ausreichend stabil für Reaktionen bei Raumtemperatur, zeigte keinerlei Denaturierungserscheinungen (wie in GRIMM und RÜDIGER, 1986 als Nachteil der Gelchromatographie angeführt) und war gut lagerfähig, wie aus Fig. 1 hervorgeht, die Absorptionsspektren und SDS-Gelelektrophorese einer Phytochromprobe zeigt, die 2.5 Jahre bei -22 °C aufbewahrt worden war. Die von GRIMM und RÜDIGER (1986) zur Reinigung von nativem Phytochrom beschriebene Methode verwendet als letzten Reinigungsschritt eine Fällung des Phytochroms mit *Polyvinylpyrrolidon* (einem klassischen Fällungsreagens für Polyphenole) und war deshalb im Rahmen der Problemstellung dieser Arbeit nicht anwendbar. Zur gezielten Modifizierung mußte nämlich sichergestellt sein, daß sämtliche niedermolekularen Verunreinigungen, dh. einerseits das bei der Extraktion nötige *2-Mercaptoethanol*, andererseits mit Phytochrom assoziierte (evtl. noch unbekannte) Kofaktoren, quantitativ entfernt worden waren. Unter allen bisher bekannten Reinigungsverfahren gewährleistet die Gelchromatographie am ehesten die quantitative Abtrennung unerwünschter Komponenten. Nach Beendigung des praktischen Teils dieser Arbeit erschien eine Vorschrift von CHAI et al. (1987), die ebenfalls eine Chromatographie an Biogel A-1.5m als letzten Reinigungsschritt verwendete und spektral außerordentlich reine Phytochromlösungen ( $SAR > 1.13$ ) lieferte.

Ebenso wie die Wahl einer geeigneten Isolierungsmethode für natives Phytochrom ist auch die Wahl einer geeigneten Modifizierungsreaktion von entscheidender Bedeutung. So kommen aus den in der Einleitung genannten Gründen von den grundsätzlich für Modifizierungen zur Verfügung stehenden Reaktionstypen nur sehr wenige in Frage. Darüber hinaus sind für etliche prinzipiell mögliche Reaktionen keine geeigneten Substrate vorhanden (Polymerisationen, Eliminationen, Fragmentierungen, Umlagerungen), bei anderen wiederum sind die äußeren Bedingungen nur schwer zu steuern (radikalische Substitutionen) oder die Gefahr der Zerstörung des Tetrapyrrol-Chromophors ist gegeben (Redox-Reaktionen, Bildung von Metallkomplexen, UV-Licht-induzierte photochemische Reaktionen).

Als aromatisches Tetrapyrrol ist der Phytochrom-Chromophor außerdem in der Lage, zahlreiche, für aromatische Systeme typische Reaktionen einzugehen, wodurch aromatische Substitutionen oder Additionsreaktionen zur spezifischen Modifizierung des Apoproteins ebenfalls ausscheiden. Somit verblei-

ben für die erforderlichen milden Bedingungen im wesentlichen nur noch nucleophile Substitutionen ( $S_N$ -Reaktionen), als potentielle Reaktionspartner sind entsprechend vor allem *Lysin* (primäres Amin) und *Cystein* (Mercaptan) geeignet. Zur kovalenten Modifizierung von 124 kDa Phytochrom wurden deshalb die in Fig. 3 dargestellten Reagentien eingesetzt, die alle diese Anforderungen erfüllen.

### 3.1.2.1. Modifizierung mit *Fluor-2,4-dinitrobenzol* (FDNB)

Die wichtigste Fragestellung bei der Modifizierung nativen Phytochroms war zunächst, welche Effekte grundsätzlich zu erwarten sein würden. Aus diesem Grund wurde zunächst die nucleophile Substitution von Lysin und Cystein mit dem relativ unspezifischen, jedoch schonenden *Fluor-2,4-dinitrobenzol* (FDNB, "SANGER's Reagens") näher untersucht. Für die Triebkraft der Reaktion ist hier vor allem der durch eine Fluor- und zwei Nitrogruppen "aktivierte", dh. stark elektrophile Aromat verantwortlich. Dennoch verläuft die Reaktion deutlich langsamer als die Umsetzung von Histidin mit *Diethyldicarbonat* (DEPC, "*Diethylpyrocarnat*") oder von Tyrosin mit dem System Alkali-Iodid / *N-Chlortoluolsulfonamid* (CAT, "*Chloramin-7*"), die bei P.H. EILFELD (1984) ausführlich beschrieben wurden.

Bisher fand FDNB vor allem bei der Endgruppenbestimmung (SANGER und SMITH, 1957) sowie bei der Sequenzierung kleinerer Proteine weite Verbreitung. Daneben wurde es in Einzelfällen auch verwendet, um selektiv eine Position einer bestimmten Aminosäure (meist Lysin) zu modifizieren, wobei die kovalent verknüpfte Dinitrophenyl-Einheit als Indikator für konformative Änderungen herangezogen werden konnte (TSONG und BALDWIN, 1972). Aus diesem Grund wurde auch natives Phytochrom mit FDNB umgesetzt, obwohl diese Reaktion als nicht sehr spezifisch beschrieben worden war (GLAZER et al., 1982). So wird neben der Lysin-Modifizierung fast ebenso häufig die analoge Umsetzung mit Cystein beobachtet, wobei die Bildung beider Endprodukte anhand deutlicher Extinktionsänderungen im Bereich von 330 bis 360 nm verfolgt werden kann.

Um nun eine Unterscheidung dieser beiden Reaktionen zu ermöglichen, wurde die pH-Abhängigkeit der Umsetzung von Phytochrom mit FDNB untersucht. Hierbei waren deutliche Reaktivitätsunterschiede zu erwarten, da Lysin im Gegensatz zu Cystein bei niedrigeren pH-Werten protoniert wird und somit

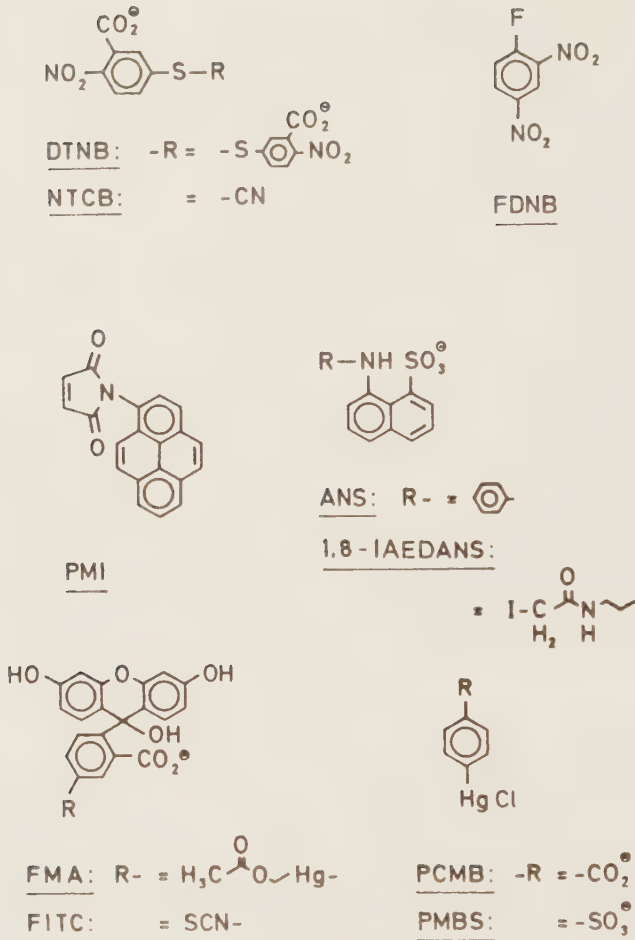


Fig. 3 : Zur chemischen Modifizierung von 124 kDa Phytochrom eingesetzte Reagentien (Strukturformeln bei pH 7-8):  
 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), 2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure (NTCB), Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB), N-(1-Pyrenyl)-maleimid (PMI), 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS), N-Iodoacetyl-N'-(8-sulfo-1-naphthyl)-ethylenediamin (1,8-IAEDANS), Fluoresceinquecksilberacetat (FMA), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), p-Chloromercuribenzoessäure (PCMB) und p-Chloromercuribenzoilsulfonsäure (PMBS)

nicht mehr substituiert werden kann. Wie Tab. 2 zeigt, nahm im vorliegenden Fall beim Übergang von pH 7.8 zu pH 7.0 (noch niedrigere pH-Werte würden die Phytochrom-Stabilität zu stark beeinträchtigen) die Anzahl umgesetzter Aminosäurereste deutlich ab. Dennoch wurden nach vergleichbaren Zeiten gleiche Produkte (dh. die gleichen photoreversiblen Systeme) gebildet.

Grundsätzlich zeigte sich, daß mit FDNB bei pH 7.8  $\leq$  30 Aminosäuren zugänglich waren, wobei  $P_{fr}$  schneller reagierte als  $P_r$ . Wurde natives Phytochrom mit  $< 10$  Resten FDNB modifiziert, konnte durch Belichtung zu einem bestimmten Zeitpunkt der Reaktion selektiv 1 Aminosäure sehr rasch modifiziert werden (P.H. EILFELD, 1984).

TAB. 2 : ABHÄNGIGKEIT DER UMSETZUNG VON PHYTOCHROM MIT FDNB VOM PH-WERT <sup>a)</sup>

|                                                   |       | $P_r$  |        | $P_{fr}$ |        |
|---------------------------------------------------|-------|--------|--------|----------|--------|
|                                                   |       | pH 7.0 | pH 7.8 | pH 7.0   | pH 7.8 |
| $k_2$ in $1 \times \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ |       | 0.26   | 0.43   | 0.30     | 0.46   |
| Umsatz <sup>c),d)</sup>                           | (1) : | 0.75   | 1.3    | 0.90     | 2.5    |
|                                                   | (2) : | ca 12  | ca 19  | ca 9     | ca 17  |
|                                                   | (3) : | ca 25  | > 25   | > 19     | > 25   |
| Restextinktion <sup>e)</sup>                      |       |        |        |          |        |
| $A_t : A_o$                                       |       | 54 %   | 42 %   | 66 %     | 58 %   |

a) Umsetzung von 0.55  $\mu\text{M}$  Phytochrom mit 0.55  $\text{mM}$  FDNB bei 298 K; b) Auswertung der ersten 5000 s (analog P.H. EILFELD, 1984); <sup>c)</sup> Anzahl modifizierter Aminosäuren, berechnet aus  $\Delta A_{350}$ : 500 s, 300 K (1); 2 Std., 300 K, dann 48 Std., 277 K (2); 2 Std., 300 K, dann 350 Std., 277 K, entspricht  $t = \infty$  (3); <sup>d)</sup> Photosystem  $P_{r,667} \rightleftharpoons P_{fr,730}$  (1);  $P_{660} \rightleftharpoons P_{720}$  (2);  $P_{660} \rightleftharpoons P_{bl}$  (3); <sup>e)</sup>  $A_{660} : A_{667}$  für  $P_r$ ,  $A_{728} : A_{730}$  für  $P_{fr}$

Ebenso waren die photochemischen Eigenschaften der Produkte abhängig vom Grad der Umsetzung (Tab. 2). Während  $\leq 3$  Reste FDNB praktisch keinen Einfluß auf die Photokonversion nahmen, zeigte die langwellige Absorptionsbande von isoliertem, mit 10-15 Resten FDNB modifiziertem Phytochrom eine geringe hypsochrome Verschiebung, die Photoreversibilität wurde jedoch nicht beeinträchtigt (System  $P_{660} \rightleftharpoons P_{728}$ ). Durch die Einführung von 20-30 Resten FDNB pro Phytochrommolekül war es an dieser Stelle erstmals gelungen, gebleichte Species ( $P_{bl}$ ) zu erhalten, deren Absorptionsspektren große Ähnlichkeit mit denen eines von REIFF et al. (1985) beschriebenen chromophorhaltigen 39 kDa Fragments besaßen und die beinahe ebenso rasche Dunkelreversion, dh. etwa die halbe Reversionsrate, zeigten (Fig. 4).

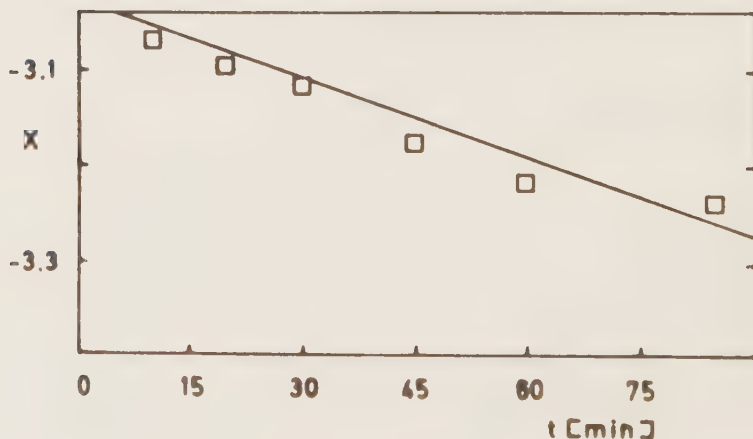


Fig. 4 : Dunkelreversion der  $P_{bl}$ -Form von mit 30 FDNB-Resten gebleichtem 124 kDa Phytochrom bei 300 K. Die Absorptionsszunahme bei 655 nm wurde im Dunkeln bestimmt und als  $X = \ln(\Delta A)$  gegen die Zeit (t) aufgetragen, wobei  $\Delta A = A_{655}(\infty) - A_{655}(t)$ . Halbwertszeit 200 Min. (vgl. 39 kDa: 101 Min. nach REIFF et al., 1985; ANS-modifiziertes Phytochrom: 180 Min. nach P.G. EILFELD, unveröffentlicht)

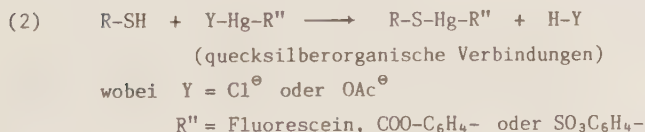
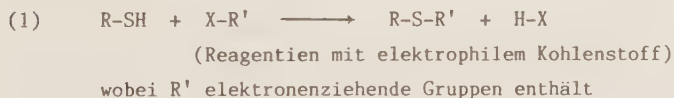
### 3.1.2.2. Spezifische Modifizierung von SH-Gruppen

#### Durchgeführte Reaktionen

Durch den Einbau von FDNB-Resten war es gelungen, die Fähigkeit zur Photo-reversion bei nativem Phytochrom schrittweise einzuschränken und die bei Modifizierung des Apoproteins allgemein auftretenden Effekte näher zu charakterisieren. Auf dieser Grundlage erschien es nunmehr interessant, den *Mechanismus* der Photokonversion näher zu betrachten und auch gezielte Versuche zu seiner Beeinflussung zu unternehmen. Zu diesem Zweck waren sowohl spezifische Modifizierungsreaktionen erforderlich als auch Reste, die das Apoprotein in irgendeiner Weise (z.B. radioaktiv, spektral oder durch Fluoreszenz) markieren und somit eine Lokalisierung der jeweils umgesetzten Aminosäuren erlauben.

Deshalb soll im folgenden die Reaktivität von SH-Gruppen gegenüber verschiedenen Reagentien sowie die spektralen Eigenschaften der entstandenen Produkte näher untersucht werden. Hierbei sollen besonders die unterschiedliche Reaktivität von  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Form sowie Chromophor-Protein-Wechselwirkungen im Vordergrund stehen.

Zu diesem Zweck wurden 2 Reaktionssysteme eingesetzt (vgl.a. Fig. 3):



Als hochspezifische Nachweisreagentien für SH-Gruppen wurden insbesondere quecksilberorganische Verbindungen wie *p*-Chloromercuribenzoessäure (PCMB), *p*-Chloromercuribenzolsulfonsäure (PMBS) oder Fluoresceinquecksilberacetat (FMA) beschrieben (MEANS und FEENY, 1971). So fanden BUTLER et al. (1964) sowie HERMANN und MÜLLER (1980) bei der Umsetzung mit proteolytisch degradiertem Phytochrom stark gebleichte Species mit mehr oder weniger eingeschränkter Photoreversibilität.

TAB. 3 : CHEMISCHE MODIFIZIERUNG VON CYSTEIN

A) ANZAHL MODIFIZIERTER SH-RESTE BEI 124 kDa HAIFER-PHYTOCHROM a),b)

| Reagens                        | rasche Modifizierung        |                     | sättigende Modifizierung |                              |                     |                 |
|--------------------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------|
|                                | Bedingungen                 | Anzahl modif. Reste |                          | Bedingungen                  | Anzahl modif. Reste |                 |
|                                |                             | P <sub>r</sub>      | P <sub>fr</sub>          |                              | P <sub>r</sub>      | P <sub>fr</sub> |
| PCMB, c)<br>PMBS, c)<br>FMA d) | 20 $\mu$ M, 30 s,<br>277 K  | 2                   | 3                        | 25 $\mu$ M, 30 Min,<br>277 K | 11                  | 11              |
| PMI d)                         | 25 $\mu$ M, 2 Std,<br>277 K | 2                   | 3                        | 25 $\mu$ M, 20 Min,<br>300 K | 9                   | 9               |
| DTNB e)                        | 1 mM, 1 Min,<br>298 K       | 2                   | 3                        | 1 mM, 2 Std,<br>298 K        | 11                  | 11              |
| NTCB e)                        | 1 mM, 1 Min,<br>298 K       | 1                   | 1                        | 1 mM, 2 Std,<br>298 K        | 15                  | 15              |
| IAEDANS d)                     | 1 mM, 5 Min,<br>277 K       | 1                   | 1                        | 1 mM, 24 Std,<br>277 K       | 3                   | 3               |

B) AUSBLEICHEN DER PHYTOCHROMABSORPTION BEI UMSETZUNG MIT SH-SPEZIFISCHEN REAGENTIEN f)

| Reagens | Modifizierung von P <sub>r</sub> |                    |      | Modifizierung von P <sub>fr</sub> |                    |      |
|---------|----------------------------------|--------------------|------|-----------------------------------|--------------------|------|
|         | Restabsorption von               |                    |      | Restabsorption von                |                    |      |
|         | P <sub>r</sub>                   | P <sub>fr</sub>    | in % | P <sub>r</sub>                    | P <sub>fr</sub>    | in % |
| PCMB    | 84                               | 84                 |      | 93                                | 86                 |      |
| PMBS    | 50                               | P <sub>bl</sub> g) |      | 46                                | P <sub>bl</sub> g) |      |
| FMA     | < 10                             | - h)               |      | < 10                              | - h)               |      |
| PMI     | 23                               | P <sub>bl</sub>    |      | 23                                | P <sub>bl</sub>    |      |
| DTNB    | 68                               | P <sub>bl</sub>    |      | 62                                | 48                 |      |
| NTCB    | 94                               | 67                 |      | 85                                | 82                 |      |
| IAEDANS | 91                               | 67                 |      | 89                                | 79                 |      |

Tab. 3 : Fortsetzung

a) aufgrund geringer Selektivität (vgl. SWOBODA und HASSELBACH, 1985) wurde FITC nicht berücksichtigt; b) Phytochromkonzentration  $1 \mu\text{M}$ ; c) Anzahl gebundener Reste spektral bestimmt (250 nm); d) Anzahl gebundener Reste bestimmt nach Gelchromatographie; e) Anzahl gebundener Reste spektral bestimmt (412 nm); f) Bedingungen: vollständige Reaktion gemäß Tab. 3 a; g) gebleichtes Phytochrom (vgl. Fig. 6 b); h) vollständig gebleichtes, dh. nicht mehr photoreversibles Phytochrom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun natives (dh. 124 kDa) Phytochrom mit PCMB, PMBS, FMA und weiteren Reagentien unter verschiedenen Bedingungen incubiert (Tab. 3 a). Hierbei erwies sich die Sulfonsäure PMBS in mehrfacher Hinsicht als vorteilhafter im Vergleich zur entsprechenden Carbonsäure PCMB, so z.B. aufgrund ihrer erheblich besseren Löslichkeit in wässrigen Puffern sowie ihrer geringeren Eigenabsorption bei 250 nm. Auch bei niedrigen Temperaturen (277 K) verliefen diese Umsetzungen außerordentlich rasch, dh. 2-3 SH-Reste reagierten innerhalb von Sekunden, was mit der Reaktivität freier Mercaptane vergleichbar ist. Die Umsetzung mit FMA war zur Detektion und quantitativen Bestimmung sogar besonders gut geeignet, da das Absorptionsmaximum des proteingebundenen Fluorescein-Chromophors genau mit dem langwelligen isosbestischen Punkt der Absorptionen von  $P_r$ ,  $P_{fr}$  und den Intermediaten der  $P_{fr}$ -Bildung (513 nm) zusammenfällt.

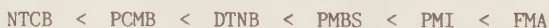
Wie bereits bei der Umsetzung mit FDNB (vgl. 3.1.2.1.) reagierte auch im Falle der SH-Gruppen-Modifizierung  $P_{fr}$  grundsätzlich schneller als  $P_r$ . Dabei bestimmte bei relativ reaktionsträgen Verbindungen wie 2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure (NTCB) und N-Iodoacetyl-N'-(8-sulfo-1-naphthyl)ethylendiamin (1,8-IAEDANS) (s.u.) das Modifizierungsreagens die Geschwindigkeit der Umsetzung, bei hochreaktiven Substanzen (z.B. PCMB, FMA) hingegen die unterschiedliche Reaktivität beider Phytochromformen.

### Einflüsse auf die Chromophor-Absorption

Obwohl der Phytochrom-Chromophor mit den angeführten Substanzen nicht direkt reagierte und deshalb ausschließlich das Apoprotein modifiziert wurde, wurden hierdurch dennoch mehr oder weniger umfangreiche Störungen in das Gesamtsystem eingeführt, die sich deutlich in Änderungen der Absorptionseigenschaften des Chromophors ausdrückten und somit auch kinetisch leicht verfolgt werden konnten; in diesem Fall diente der Phytochrom-Chromophor somit als sehr empfindliche Sonde zur Erfassung von strukturellen Veränderungen des Apoproteins.

Tab. 3 b zeigt eine Zusammenfassung der photochemischen Eigenschaften modifizierter Phytochrome in Abhängigkeit von der Anzahl umgesetzter SH-Reste. Hierbei fällt auf, daß die erhaltenen Ergebnisse sowohl von der Struktur und der Konzentration der eingesetzten Reagentien als auch von den äußeren Bedingungen wie Temperatur und Belichtung abhängen.

Allgemein war die Umsetzung von mehreren SH-Gruppen stets mit Änderungen des Phytochrom-Chromophorspektrums verbunden. Dies gilt nicht nur für quecksilberorganische Verbindungen, sondern auch für die anderen verwendeten Reagentien 5,5'-Dithiohis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), NTCB und *N*-(1-pyrenyl)-maleimid (PMI). Dabei trat bei exzessiver Modifizierung auch bei nativem Phytochrom Bleichung auf, wobei das Ausmaß der Bleichung mit der Größe des eingeführten Restes (vgl. hierzu Fig. 3) zunahm, dh. :



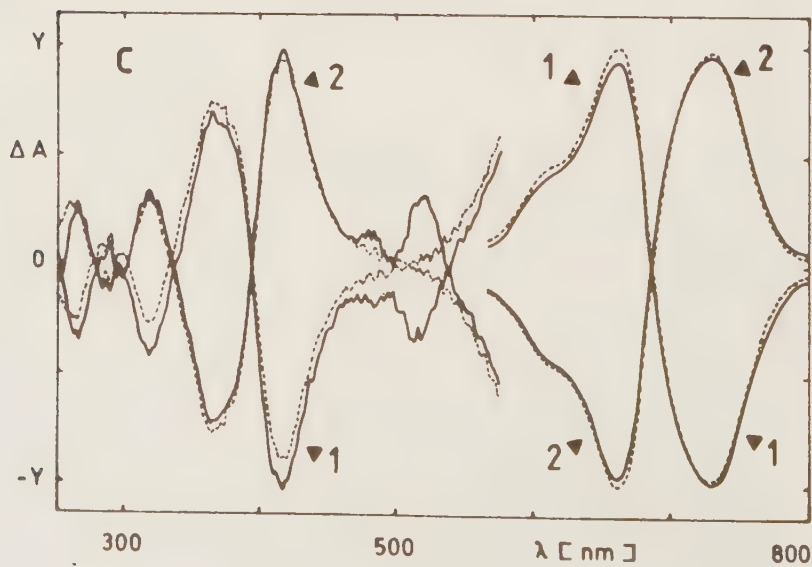
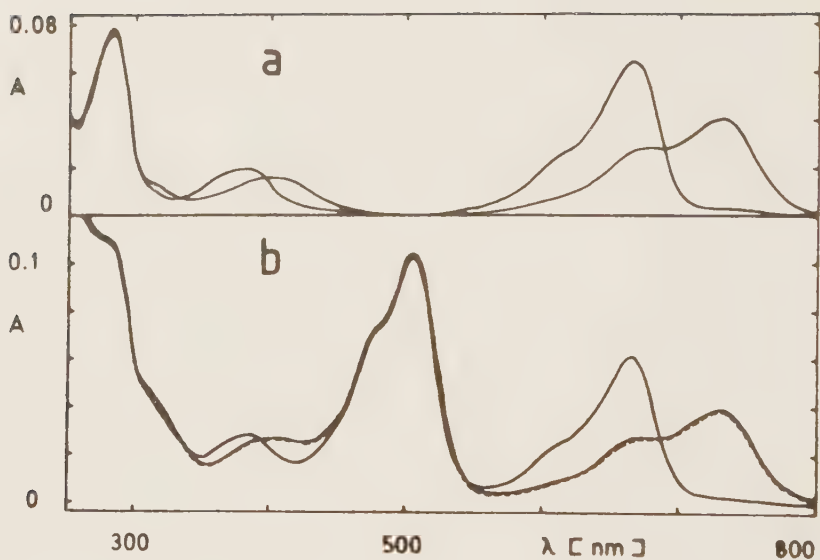
Dabei war im vorliegenden Fall die Bleichung des  $P_{fr}$ -Spektrums im allgemeinen stärker, wenn  $P_r$  modifiziert worden war, und auch  $P_{bl}$ -artige Species wurden mit höherer Wahrscheinlichkeit gebildet (Tab. 3 b). Ähnliche rein sterische Effekte waren bereits bei der Inaktivierung von Enzymen mit NTCB im Vergleich zu DTNB beobachtet worden (STARK, 1977). In diesem Fall war die Inaktivierung nicht durch die Modifizierung von SH-Gruppen allein bewirkt worden, sondern erst durch die Bindung des ziemlich voluminösen Thionitrobenzoat-Restes.

Die beobachteten Ausbleicheffekte konnten zu der Anzahl modifizierter Aminosäuren in Beziehung gesetzt werden, indem die Phytochromlösungen mit stöchiometrischen Mengen quecksilberorganischer Verbindungen umgesetzt wurden. Wie Fig. 5 a zeigt, traten keine signifikanten spektralen Änderungen auf, wenn 3 SH-Gruppen oder weniger modifiziert wurden. Die Modi-

fizierung weiterer SH-Gruppen rief jedoch eine intensive Bleichung hervor, von der besonders das  $P_{fr}$ -Spektrum betroffen war. Die langwellige Absorptionsbande wurde von 730 nach 720 nm verschoben, die kurzwellige Bande von 400 nach 390 nm (Fig. 6 a). Vergleichbare Absorptionsspektren wie in Fig. 6 b wurden bereits für ein 39 kDa Fragment beschrieben (REIFF et al., 1985), das durch proteolytischen Abbau von 124 kDa Hafer-Phytochrom erhalten worden war. Im Falle dieses Peptides wurde das Verschwinden der  $P_{fr}$ -Absorption darauf zurückgeführt, daß die ziemlich spezifische Wechselwirkung des Chromophors mit einem bestimmten Teil der Proteinkette nicht mehr möglich war. Ähnliche Effekte kann man auch hier vermuten. So ist als wahrscheinlich anzunehmen, daß trotz intakter Molekularmasse (auch nach exzessiver Modifizierung nur eine Bande bei 124 kDa auf SDS-Gelen) die Chromophor-Protein-Wechselwirkungen durch Intercalation der eingesetzten Modifizierungsreagentien beeinträchtigt oder gar aufgehoben wurden. Allerdings hängen die beobachteten Einflüsse in hohem Maße vom eingesetzten Reagens ab. So waren durch Modifizierung von SH-Gruppen gebleichte Species zwar photoreversibel, zeigten jedoch keine Dunkelreversion, wie sie bei 39 kDa Phytochrom (REIFF et al., 1985), bei ANS-gebleichtem Material oder bei Umsetzung mit FDNB (vgl. 3.1.2.1.) beobachtet worden war.

Wurde für etwa 2 Std. mit FMA incubiert ( $30 \mu\text{M}$  FMA, 298 K), entstanden extrem gebleichte Formen mit einer molaren Extinktion von etwa  $10\,000 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  bei 660 nm, die keinerlei Photoreversibilität mehr zeigten (Fig. 7). Diese Species unterschieden sich signifikant von anderen gebleichten Formen mit etwa doppelt so hohem Extinktionskoeffizienten (THÜMLER und RÜDIGER, 1984; P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985; REIFF et al., 1985). Änderungen im Chromophorspektrum, die durch diese exzessive Modifizierung hervorgerufen worden waren, erwiesen sich als irreversibel, wie Kurve 3 in Fig. 7 zeigt. Zwar konnten die Fluoresceinreste wieder quantitativ vom Protein abgespalten werden, wobei auch die erwarteten spektralen Änderungen auftraten (nämlich hypsochrome Verschiebung und ansteigende Fluorescein-Absorption), die Änderungen des Phytochrom-Chromophorspektrums konnten jedoch nicht rückgängig gemacht werden. Insbesondere konnte die Fähigkeit des Tetrapyrrol-Chromophors zu photochromem Verhalten selbst nach intensiver Dialyse und nahezu vollständiger (>95%) Entfernung der gebundenen FMA-Reste nicht wiederhergestellt werden.

NTCB, DTNB und PMI lieferten prinzipiell gleiche Resultate, allerdings wurde kein vollständig gebleichtes Phytochrom (wie im Falle der FMA-Modi-



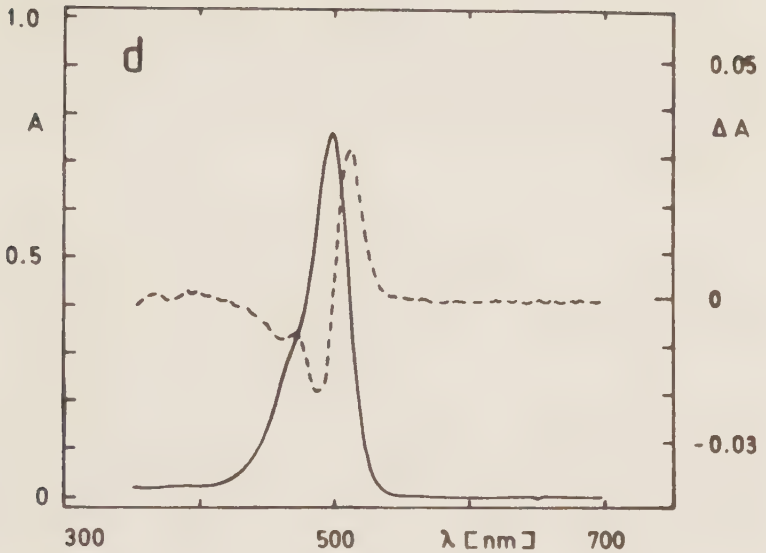


Fig. 5 : FMA als chemische Sonde :

- a) Absorptionsspektren von unmodifiziertem 124 kDa Hafer-Phytochrom in 20 mM KPP, pH 7.8
- b) Absorptionsspektren desselben Materials nach Modifizierung (3 Molequivalente FMA gebunden an  $P_{fr}$ ), 1 Belichtungszyklus:  $P_{fr}$  (—)  $\rightarrow$   $P_r$  (—)  $\rightarrow$   $P_{fr}$  (---)
- c) Absorptions-Differenzspektren von modifiziertem Phytochrom (—, aus Fig. 5b) und unmodifiziertem Phytochrom zum Vergleich (---, aus Fig. 5a).  $Y=0.01$  für den Wellenlängenbereich unterhalb von 580 nm und  $Y=0.04$  für Wellenlängen darüber; Differenzspektrum  $P_r$  minus  $P_{fr}$  für Phototransformation  $P_{fr} \rightarrow P_r$  (1) sowie  $P_{fr}$  minus  $P_r$  für Phototransformation  $P_r \rightarrow P_{fr}$  (2)
- d) Lösungsmittelinduzierte Absorptionsänderungen des Fluoresceinchromophors beim Übergang von reinem KPP zu KPP mit 6% (v/v) Glycerin; jeweils 10  $\mu$ M FMA: Absorptionsspektrum (—) und Differenzspektrum FMA in KPP/Glycerin minus FMA in reinem KPP (---)

fizierung) gebildet. Bei 30 minütiger Incubation mit  $25 \mu\text{M}$  PMI konnten sogar bei höheren Temperaturen (300 K) noch photoreversible Species erhalten werden. Mit NTCB, dem kleinsten eingeführten Rest, wurde die größte Anzahl von Cysteinen modifiziert und die geringsten spektralen Änderungen hervorgerufen (vgl. Tab. 3). Im Fall dieser Reaktion war es überhaupt nicht möglich,  $P_{bl}$  zu erhalten.

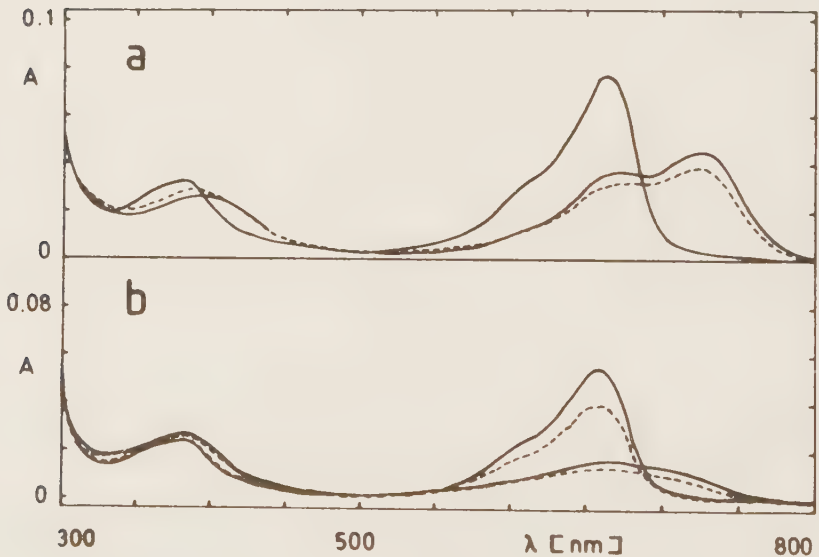


Fig. 6 : Spektrale Veränderungen bei der Umsetzung von 124 kDa Hafer-Phytochrom mit PMBS :

- a) Umsetzung von  $0,84 \mu\text{M}$   $P_{fr}$  mit  $12,6 \mu\text{M}$  PMBS (Incubation 500 s bei 298 K); 7 modifizierte Reste (berechnet aus  $A_{250}$ ); 1. Belichtungszyklus:  $P_{fr}$  (—)  $\rightarrow$   $P_r$  (—)  $\rightarrow$   $P_{722}$  (---)
- b) Umsetzung von  $0,84 \mu\text{M}$   $P_r$  mit  $25 \mu\text{M}$  PMBS (Incubation 24 Std. bei 277 K oder 60 Min. bei 298 K); 10-11 modifizierte Reste (berechnet aus  $A_{250}$ ); Bildung eines mehrfach photoreversiblen Systems  $P_{660} \rightleftharpoons P_{bl}$ : erster (—) und zweiter (---) Belichtungszyklus

Um nun die Frage zu klären, ob die Empfindlichkeit des Phytochrommoleküls gegenüber SH-Gruppen-modifizierenden Reagentien von der Unversehrtheit des Apoproteins abhängt, wurde natives Phytochrom mit Trypsin zum 59 kDa Peptid abgebaut und anschließend ebenfalls mit FMA oder NTCB umgesetzt. Dabei bewirkte die Modifizierung mit 6 Molequivalenten FMA bereits vollständiges Ausbleichen, während mit 1 Molequivalent lediglich eine leichte Blei-

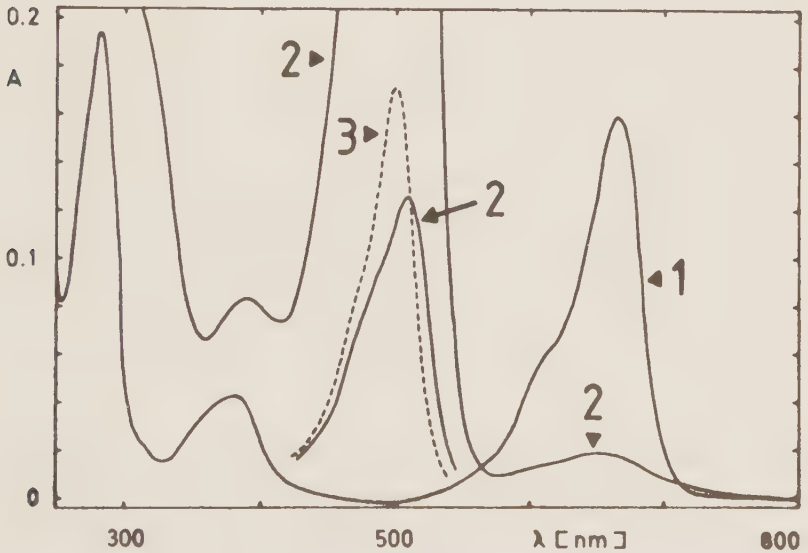


Fig. 7 : Bildung von vollständig gebleichten, nicht mehr photoreversiblen Species durch Umsetzung mit FMA  
1) unmodifiziertes  $P_r$  ( $1.45 \mu M$ )  
2)  $1.45 \mu M P_r$ , mit  $14.5 \mu M$  FMA für 48 Std. bei 277 K incubiert; die Lage des Maximums bei 513 nm zeigt die Vollständigkeit der Bindung; Extinktion 0-1.0 im verkleinerten mittleren Teil des Spektrums  
3) Abspaltung des FMA-Chromophors durch Zugabe von  $30 mM$  2-Mercaptoethanol und Incubation für 15 Min. bei 298 K; Absorptionsmaximum bei 502 nm zeigt die Vollständigkeit der Ablösung (---, Extinktion 0-1.0); keine Beeinflussung des Phytochrom-Chromophors durch diese Behandlung, dh. irreversible, FMA-induzierte Denaturierung

chung ( $< 10\%$ ) der langwelligen  $P_{fr}$ -Absorption auftrat. Mit dem erheblich kleineren NTCB waren in diesem Fall 7-8 SH-Gruppen zugänglich, wobei die Photoreversibilität erhalten blieb. Neben einer hypsochromen Verschiebung der  $P_{fr}$ -Absorption von 722 nach 718 nm wurden lediglich  $< 5\%$  Bleichung beobachtet. Allgemein bleibt festzuhalten, daß die Modifizierung von SH-Gruppen bei 59 kDa Phytochrom ähnliche Effekte hervorrief wie bei 124 kDa Phytochrom. Entsprechend der geringeren Molekularmasse waren jedoch weniger zugängliche Cystein-Reste vorhanden.

Kovalent gebundene Chromophore (wie im vorliegenden Fall der Fluorescein-Chromophor in FMA oder der Pyren-Chromophor in PMI) sind allgemein außerordentlich nützliche Hilfsmittel, um Veränderungen der Chromophor-Umgebung sichtbar zu machen. Man spricht deshalb auch von *chemischen Sonden* ("reporter groups", vgl. CANTOR und SCHIMMEL, 1980), da anhand der charakteristischen Absorptionseigenschaften des eingeführten Chromophors Rückschlüsse auf Art und Umfang der in der betreffenden Umgebung eingetretenen Veränderungen gezogen werden können.

Zu diesem Zweck wurde nun natives Phytochrom mit  $\leq 3$  Molequivalenten FMA umgesetzt, um eine Beeinträchtigung der Tetrapyrrol-Absorption auszuschließen (vgl. Fig. 5a,b). Wie Fig. 5c zeigt, konnten im vorliegenden Fall selbst geringfügige Beeinflussungen der FMA-Absorption auf einfache Weise nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, daß die Phototransformation von  $P_r$  zu  $P_{fr}$  mit einem Anstieg in der langwelligen Flanke der FMA-Absorptionsbande einherging, was im Differenzspektrum (Fig. 5c) deutlich zu erkennen war. In dieser Hinsicht fallen Ähnlichkeiten mit entsprechenden lösungsmittelinduzierten Absorptionsveränderungen auf; so zeigt Fig. 5d die Absorptionsänderungen, die auftraten, wenn ungebundenes FMA aus reiner wässriger Lösung in Puffer mit 6% *Glycerin*-Zusatz überführt wurde. Der Glycerinpuffer entspricht hierbei einem stärker hydrophoben Medium, so daß man im Falle von FMA-modifiziertem Phytochrom davon ausgehen kann, daß die chemische Sonde in der  $P_{fr}$ -Form eine stärker hydrophobe Chromophorumgebung anzeigt. Da die FMA-Modifizierung unter den gewählten Bedingungen jedoch die Absorption des Tetrapyrrol-Chromophors nicht beeinflusste (s.o.), handelt es sich bei dem beobachteten Effekt wohl um eine spezifische Eigenschaft des nativen Apoproteins.

### Peptid-Kartierung

Zum besseren Verständnis der komplexen Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein bei der Photokonversion sind modifizierte Phytochrome insbesondere dann von Nutzen, wenn die Position der modifizierten Reste - zumindest annähernd - bekannt ist. Außerdem könnten bekannte reaktive Gruppen auf der Proteinoberfläche nähere Hinweise auf eventuelle Rezeptor-bindungsstellen oder aktive Zentren (FERSHT, 1985) geben.

Um diesem Ziel näher zu kommen, sollte natives Phytochrom zunächst mit NTCB umgesetzt werden, da mit dieser Reaktion bei *Haloerhodopsin* eine selektive Spaltung an einem Cystein erreicht worden war (SCHEGK et al., 1986). Im Gegensatz zu Literaturvorschriften (STARK, 1977; SCHEGK et al., 1986) waren zur Spaltung von Phytochrom allerdings ziemlich drastische Bedingungen erforderlich, was auf der Stabilität der Sekundärstruktur (3.1.1.) beruht. Außerdem war es nicht möglich, Phytochrom mit NTCB umzusetzen, den Überschuß Reagens abzutrennen und dann die alkalische Spaltung durchzuführen. Vermutlich hydrolysierte der gebildete Thioester wieder rasch zum Sulfid, noch bevor eine Spaltung eintreten konnte. Jedoch wurde Phytochrom in Gegenwart von NTCB spontan gespalten, wobei definierte Produkte mit Molekularmassen von 104 ( $\pm$  4), 90, 79, 70, 67, 59 und 49 kDa entstanden (vgl. Fig. 8).

Zur Erklärung dieses Spaltmusters kann man annehmen, daß im ersten Schritt bei Cystein 222 ( $\rightarrow$  102 kDa Fragment) oder bei Cystein 940 ( $\rightarrow$  104 kDa Fragment) gespalten wurde; für die erste Möglichkeit spricht, daß es gelang, auch das entsprechende Gegenstück mit einer Masse von etwa 22 kDa zu finden (Fig. 8). Eine genauere Lokalisierung der folgenden Schnittstellen war jedoch wegen der dichten Abfolge von Cysteinresten in der Aminosäurenkette und der daher zu ungenauen Molekularmassenbestimmung der erhaltenen Peptide nicht möglich. Aus diesem Grund soll auch auf eine detaillierte Analyse verzichtet werden, zumal NTCB-Peptide einen blockierten N-Terminus besitzen und daher nicht sequenzierbar sind (STARK, 1977). Nachdem die Bedingungen der Spaltung nur mäßig denaturierend waren (aufgrund der Abwesenheit von 2-Mercaptoethanol erfolgte keine Auffaltung durch Spaltung der Disulfidbrücken), kann man annehmen, daß die bevorzugte Spaltung vom Ende her (dh. vom N- bzw. C-terminalen Bereich ausgehend) erfolgte, was auf eine räumliche Exposition dieser Bereiche hinweist.

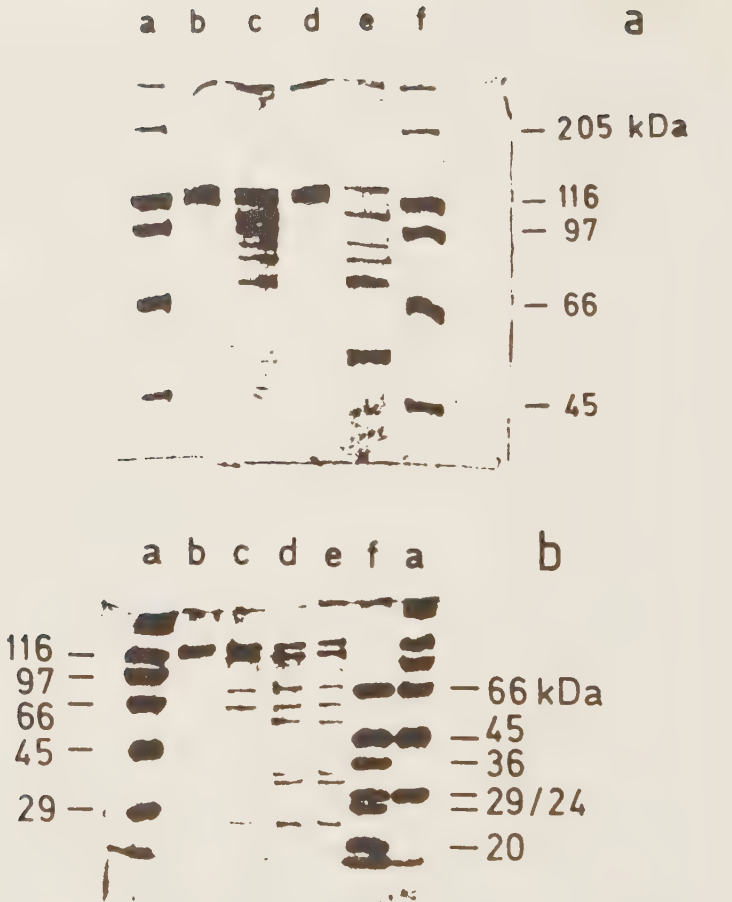


Fig. 8 : NTCB-Spaltung von 124 kDa Phytochrom und Auftrennung der Produkte durch SDS-Gelelektrophorese :  
a) 7.5% Polyacrylamid, Coomassie-Färbung : Eichproteine (Spur a und f), 118/124 kDa Phytochrom (Spur b), 118/124 kDa Phytochrom nach 45 Min. Incubation mit NTCB (Spur c), 124 kDa Phytochrom (Spur d) und 124 kDa Phytochrom nach 45 Min. Incubation mit NTCB (Spur e)  
b) 12% Polyacrylamid, Coomassie-Färbung : Eichproteine (Spur a und f), 124 kDa Phytochrom vor Incubation (Spur b), nach 5 Min. Incubation (Spur c), nach 15 Min. Incubation (Spur d) und nach 45 Min. Incubation, Bildung des 102 und des 22 kDa Fragments (Spur e)

Um nun die Position der reaktivsten SH-Reste eindeutiger bestimmen zu können, wurde natives Phytochrom zunächst mit 1 bzw. 3 Molequivalenten FMA umgesetzt. Das so markierte Protein wurde anschließend mit Trypsin proteolytisch gespalten, da Peptide aus tryptischem Abbau bestimmten Abschnitten der Primärstruktur eindeutig zugeordnet werden konnten (GRIMM et al., 1986). Hierbei stellte sich heraus, daß die Kartierung tryptischer Peptide bei modifiziertem und unmodifiziertem Phytochrom identische Muster lieferte (nicht abgebildet; tryptische Spaltstellen s. Fig. 9). Aus diesem Grund war die Lokalisierung modifizierter Peptide nach ihrer Abtrennung auf unproblematische Weise möglich.

Fig. 10a zeigt die spektralen Änderungen, die während der Proteolyse FMA-markierten Phytochroms auftraten. Die Bedingungen wurden hierbei so gewählt, daß die Proteolyse bis zur Bildung des chromophorhaltigen 39 kDa Peptids ablief. Dieser Abbau bewirkte nicht nur Absorptionsänderungen des Tetrapyrrols, sondern auch des Fluorescein-Chromophors, dessen Hauptbande um etwa 10% zunahm und von 513 nach 502 nm verschoben wurde. Ähnliche, jedoch viel deutlichere Effekte traten bei der Zugabe freier Mercaptane zu proteingebundenem FMA auf, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität die ansonsten recht stabile Protein-S-Hg-Bindung spalten (vgl. Kurve 3 in Fig. 7). Die Ursache für die beobachteten Effekte ist also offensichtlich,

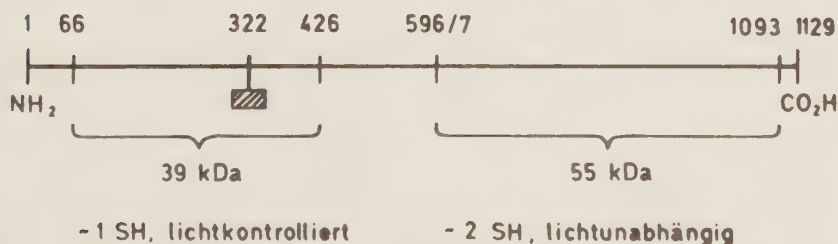
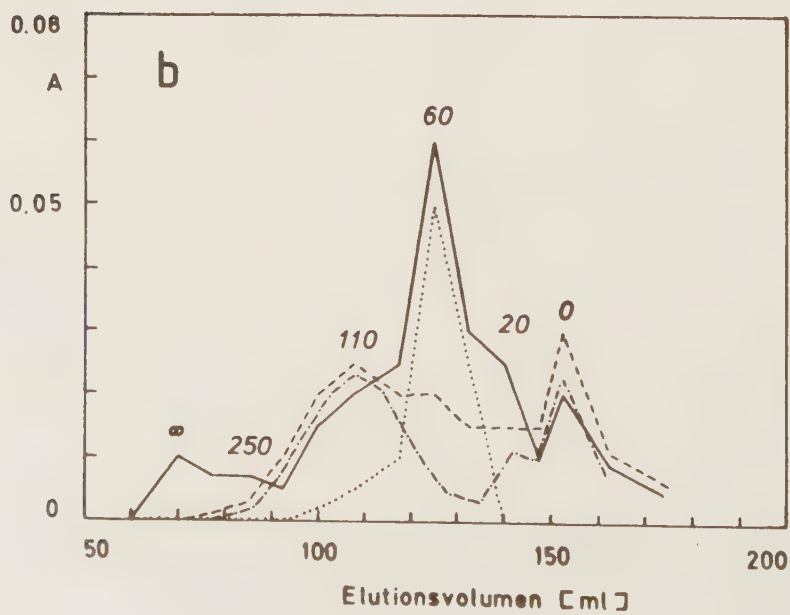
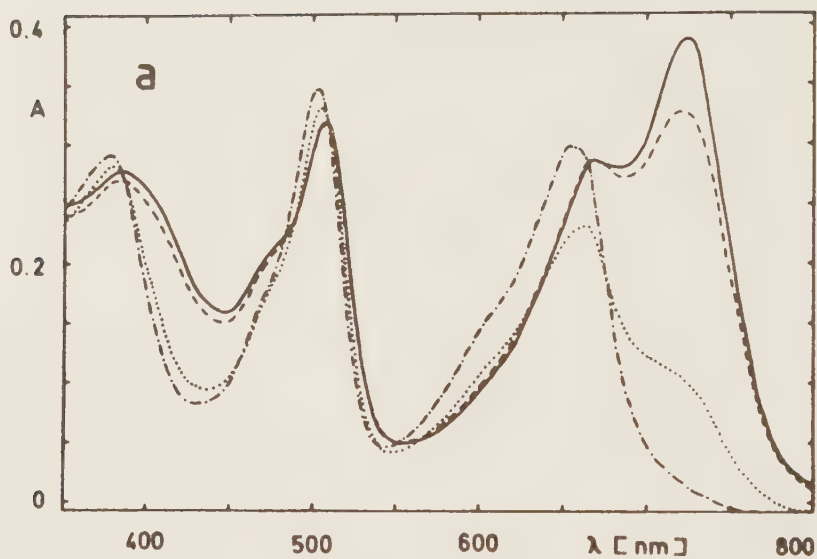


Fig. 9 : Eindimensionales Phytochrommodell: Die markierten Positionen bezeichnen tryptische Spaltungsstellen (nach GRIMM et al., 1986), das schraffierte Rechteck bei Aminosäure 322 stellt die Position des Tetrapyrrol-Chromophors dar



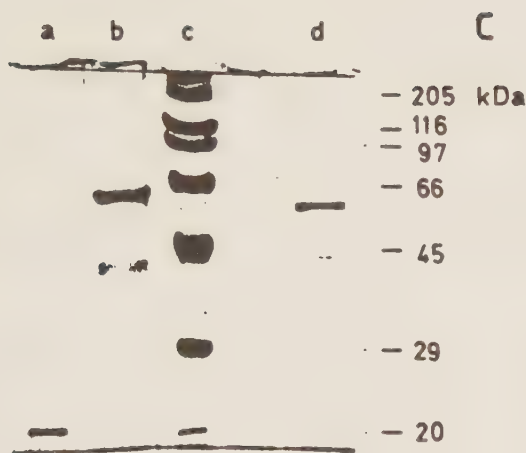


Fig. 10 : Tryptischer Abbau von FMA-markiertem 124 kDa Phytochrom :

a) Spektrale Änderungen bei der Proteolyse von  $P_{fr}$  (markiert mit 1.0 Molequivalenten FMA) mit 1% (w/w) Trypsin : modifiziertes  $P_{fr}$  vor Trypsin-Zugabe (—), 1 Min. (---), 30 Min. (....) und 2 Std. (----) nach Incubation mit Trypsin

b) Gelchromatographische Trennung tryptischer Peptide aus dem Abbau von  $P_{fr}$  (modifiziert mit 3 Molequivalenten FMA) bis zur Bildung des 59 kDa Chromopeptids (Bedingungen s. 2.3.2.1.) ; Elutionsprofile : Absorption bei 280 nm (—), 504 nm (---) und 664 nm (....); zum Vergleich Elutionsprofil des tryptischen Abbaus von analog modifiziertem  $P_r$  (----); die kursiven Zahlen geben die Molekularmassen nativer Proteine an (erhalten mit Hilfe von Eichproteinen)

c) Gelelektrophorese (10% Polyacrylamid, Coomassie-Färbung) der Hauptfraktionen aus der Gelchromatographie von Fig. 10 b : Elutionsvolumen 140 ml (Trypsin-Inhibitor, Spur a), Elutionsvolumen 125 ml (59 kDa Chromopeptid, verunreinigt mit ebenfalls chromophorhaltigem 52 und 39 kDa Peptiden, vgl. GRIMM et al., 1986; Spur b), Eichproteine (Spur c) und Elutionsvolumen 110 ml (chromophorfrees 55 kDa Peptid, dimerisiert, Spur d)

daß der Fluorescein-Chromophor keine nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit dem Protein mehr eingehen kann und in die wässrige Phase übergeht, was mit der bei der Proteolyse eintretenden Fragmentierung verbunden ist.

Die gelchromatographische Trennung tryptischer Peptide ist in Fig. 10 b dargestellt. FMA-markierte Peptide konnten demnach von chromophorhaltigen Peptiden getrennt werden. Hierbei sprechen mehrere Beobachtungen dafür, daß diese chromophorfreen aber markierten Peptide zu einem 55 kDa Fragment gehören, das auf der C-terminalen Hälfte der Primärstruktur lokalisiert ist (Aminosäure 596/597 - 1093, nach GRIMM et al., 1986). Trotz einer Masse von  $\approx 55$  kDa auf denaturierenden SDS-Gelen wanderten diese Peptide nämlich schneller als chromophorhaltige 59 kDa Peptide, dh. erschienen bei geringerem Elutionsvolumen (Fig. 10 c). Dies deutet auf Aggregation des 55 kDa Fragments hin, was mit Untersuchungen von JONES und QUAIL (1986) übereinstimmt, wonach die C-terminale Hälfte eine Dimerisierungssequenz enthält. Da die C-terminale Hälfte sehr empfindlich gegenüber Proteasen ist (QUAIL et al., 1986), war die entsprechende Fraktion zudem in den meisten Fällen (auch bei sehr kurzer Incubation mit Trypsin) mit kleineren Bruchstücken, insbesondere mit Molekularmassen um 42 kDa, verunreinigt. Die bevorzugt mit FMA markierten Peptide waren chromophorfrei, wie anhand der Absorptionsspektren sowie mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierung des Tetrapyrrol-Chromophors (nach BERKELMAN und LAGARIAS, 1986) gezeigt werden konnte. Da die C-terminale Hälfte sehr rasch weiter fragmentierte (s.o.) war eine genauere Lokalisierung der FMA-modifizierten SH-Gruppen jedoch bisher nicht möglich.

Bei Umsetzung mit 3 Molequivalenten FMA wurden auch chromophorhaltige Peptide markiert, insbesondere ein 59 kDa (Aminosäure 63/66 - 596/597) und ein 39 kDa (63/66 - 426) Chromopeptid. Bei Incubation in der  $P_r$ -Form nahm das Ausmaß der Markierung signifikant ab (Fig. 10 b). Deshalb ist es wahrscheinlich, daß dieser Bereich für die unterschiedliche Reaktivität von  $P_r$  und  $P_{fr}$  (mit)verantwortlich ist, bzw. daß sich in Chromophornähe eine lichtkontrollierte SH-Gruppe befindet (Tab. 4).

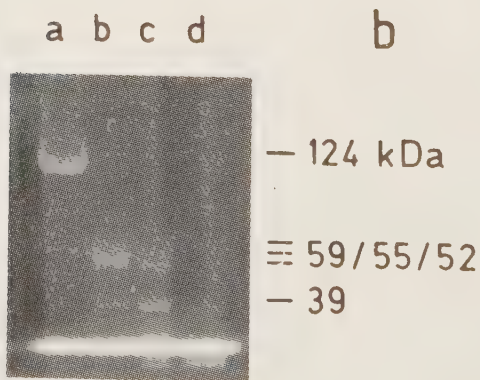
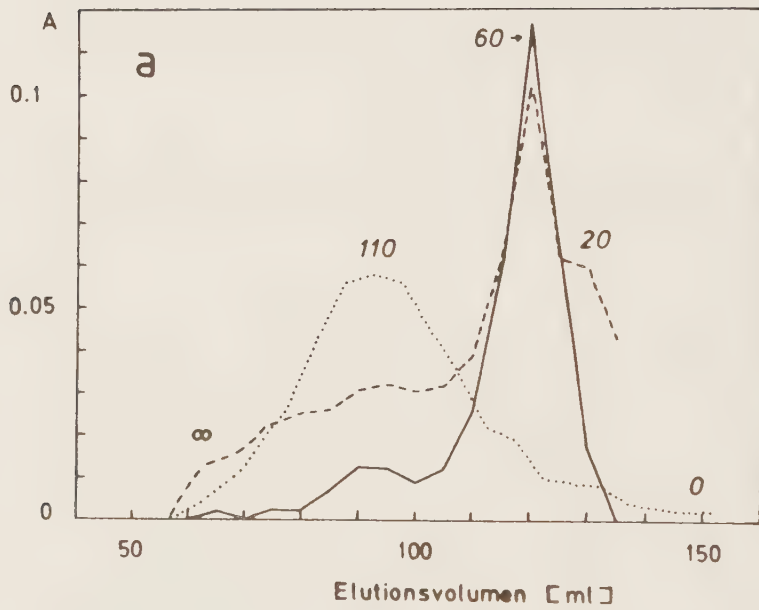
Aus Tab. 4 wird ebenfalls ersichtlich, daß diese SH-Gruppe, die auf dem 39 kDa Peptid lokalisiert wurde, in der  $P_{fr}$ -Form exponiert ist, nicht jedoch in der  $P_r$ -Form. Wurde Phytochrom mit genau 1 Molequivalent FMA umgesetzt, zeigte sich keinerlei Unterschied in der Reaktivität von  $P_r$  und  $P_{fr}$ , dh. FMA reagierte bevorzugt mit einem der zugänglichen Cysteine auf der C-terminalen Hälfte. Bei Incubation mit 3 Molequivalenten wurde eine inten-

sive Markierung des 39 kDa Peptids jedoch nur in der  $P_{fr}$ -Form gefunden. Auch dieses Cystein konnte bisher nicht genauer lokalisiert werden, da unter Sequenzierungsbedingungen die S-Hg-C-Bindung sehr leicht gespalten wird und kleinere tryptische Peptide nur sehr schwierig in hochreiner Form zu erhalten sind, was aber die Grundvoraussetzung für eine genaue Lokalisierung wäre.

TAB. 4 : KARTIERUNG VON TRYPTISCHEN, FMA-MARKIERTEN <sup>a),b)</sup> PEPTIDEN

| Incubations-<br>bedingungen <sup>a)</sup> | Peptide                                  |                                             |                                                |
|-------------------------------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                           | 55 kDa C-term.<br>596-1093 <sup>c)</sup> | 59 kDa N-term.<br>63/66 - 596 <sup>c)</sup> | 39 kDa N-terminal<br>63/66 - 426 <sup>c)</sup> |
| $P_r$ + 1 FMA                             | 0.5                                      | < 0.15                                      | < 0.15                                         |
| $P_{fr}$ + 1 FMA                          | 0.6                                      | < 0.15                                      | < 0.15                                         |
| $P_r$ + 3 FMA                             | 1.1                                      | 0.15 <sup>d)</sup>                          | 0.25                                           |
| $P_{fr}$ + 3 FMA                          | 1.1                                      | 0.45 <sup>d)</sup>                          | 0.55                                           |

<sup>a)</sup> Incubationsbedingungen und Auftrennung s. 2.3.1.3. und 2.3.2. (als Beispiel vgl. Fig. 10 b); <sup>b)</sup> Ausgewertet wurden nur Absorptionsspektren von reinen Fraktionen mit nur 1 Bande auf SDS-Gelen; die Berechnung erfolgte anhand der Extinktionskoeffizienten von  $\epsilon_{508} = 48\,000$  und  $\epsilon_{280} = 9\,000$  für gebundenes FMA (HEITZ und ANDERSON, 1968); die Proteinkonzentration wurde aus der Absorption bei 280 nm nach Abzug der Eigenabsorption von FMA berechnet unter der Annahme einer Konzentration von 1 mg/ml für  $A_{280} = 1.0$  (vgl. COOPER, 1981); aus diesem Wert und aus der Molekularmasse (bestimmt durch SDS-Gelelektrophorese) wurde die molare Absorption bei 280 nm berechnet; der Fehler der so erhaltenen Werte beträgt aufgrund von überlappenden Proteinbanden (vgl. Fig. 10 b) etwa 0.1; <sup>c)</sup> Die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäuren (vgl. Fig. 9); <sup>d)</sup> Dieser Unterschied wird aus Fig. 10 b besonders deutlich; die dort angegebenen Werte beziehen sich auf paarweise identische Proben



Trotz hoher Spezifität ist FMA jedoch kein optimales Reagens zur *Fluoreszenzmarkierung* (die von großer praktischer Bedeutung wäre), vor allem aufgrund seiner geringen Fluoreszenz-Quantenausbeute nach Reaktion mit SH-Gruppen (KARUSH et al., 1964) und seiner hohen Reaktivität gegenüber freien Mercaptanen, die bewirkt, daß der Fluorescein-Chromophor sehr leicht wieder vom Protein abgespalten wird. Deshalb war es unmöglich, FMA-markierte Peptide auf SDS-Gelen zu trennen und ihre Fluoreszenz sichtbar zu machen, da hierbei zur Auffaltung der Peptidkette *2-Mercaptoethanol* in hoher Konzentration zugegeben werden muß.

Beide Nachteile konnten umgangen werden, indem 1,8-IAEDANS zur Fluoreszenzmarkierung eingesetzt wurde (Fig. 11 b, Spur a). Allerdings reagierte 1,8-IAEDANS erheblich unspezifischer als FMA. So kann neben Cystein v.a. auch *Lysin* modifiziert werden (WU und STRYER, 1972; HOUK und PUTNAM, 1973);

Fig. 11 : Tryptischer Abbau von 1,8-IAEDANS-markiertem Phytochrom (Bedingungen vgl. 2.3.1.7. und 2.3.2.2.) :

a) Gelchromatographische Trennung von Peptiden aus tryptischem Abbau bis zum 59 kDa Chromopeptid; Elutionsprofile : Absorption bei 664 nm (—) und 280 nm (---); zum Vergleich ist die relative Fluoreszenzintensität von gebundenem 1,8-IAEDANS bei 480 nm (Anregung bei 365 nm) angegeben (----); für die Hauptfraktionen bei 90-95 ml Elutionsvolumen (55 kDa chromophorfrees Peptid lt. SDS-Gelelektrophorese) wurde anhand der molaren Extinktionskoeffizienten ein IAEDANS : Protein-Verhältnis von 2.4 : 1 ermittelt, für die Fraktion bei 120 ml Elutionsvolumen (59 kDa Chromopeptid lt. SDS-Gelelektrophorese) ein Verhältnis von 1.3 : 1 (vgl. a. Tab. 4); die kursiven Zahlen geben die Molekularmassen nativer Proteine an (erhalten mit Hilfe von Eichproteinen)

b) Sichtbarmachung von mit 1,8-IAEDANS fluoreszenzmarkiertem Phytochrom auf 7.5 % SDS-Polyacrylamid-Gelen; Anregung bei 303 nm, photographiert auf Kodak Ektachrom 100 (Blende 8, 20 s) : 30 µg 124 kDa Phytochrom, markiert mit 3 Molequivalenten 1,8-IAEDANS (Spur a), nach 1 Min. Abbau mit 1.5 % (w/w) Trypsin, Bildung von 52, 55 und 59 kDa Peptiden (Spur b), nach 6 Min. Abbau, Bildung des 39 kDa Chromopeptids (Spur c) und nach 45 Min. Abbau, keine Peptide mit Molekularmassen über 25 kDa markiert (Spur d); die angegebenen Molekularmassen wurden mit Hilfe von Coomassie-Färbung bestimmt

außerdem konnten sowohl spektral als auch bei der Peptid-Kartierung keinerlei Unterschiede zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  gefunden werden.

Allerdings ergab sich bei der Gelchromatographie ein ähnliches Peptidmuster wie für FMA-modifiziertes Phytochrom beschrieben (s.o.). So fanden sich die meisten IAEDANS-modifizierten Reste im chromophorfreen 55 kDa Peptid, was deutlich anhand der typischen blauen Fluoreszenz des protein-gebundenen substituierten Naphthyl-Chromophors gezeigt werden konnte (s. Fig. 11 a). Auch IAEDANS-modifizierte Chromopeptide konnten erhalten und anhand ihrer Absorptionsspektren charakterisiert werden. Allerdings war hier im nativen Zustand keine Fluoreszenz zu erkennen, sondern erst nach der Denaturierung, also z.B. auf SDS-Gelen (Fig. 11 b). Diese Ergebnisse deuten auf wichtige Unterschiede zwischen C- und N-terminalem Fragment hin.

Wie im Falle der FMA-Modifizierung wurde auch hier ein markiertes 39 kDa Chromopeptid erhalten, was leicht anhand der Fluoreszenz auf SDS-Gelen sichtbar gemacht werden konnte (Fig. 11 b). Weiterer Abbau mit höheren Trypsinkonzentrationen lieferte zuerst ein 31 kDa, später hauptsächlich ein 23.5 kDa Chromopeptid (Aminosäure 210 - 426, nach GRIMM et al., 1986). Hierbei fiel auf, daß zwar das 31 kDa Bruchstück auf SDS-Gelen noch fluoreszierte, das 23.5 kDa Bruchstück hingegen nicht mehr. Hieraus kann man schließen, daß die Modifizierung zwischen Aminosäure 63/66 und 210 erfolgte. Hierfür spricht auch, daß ein fluoreszierendes Fragment von etwa 15 kDa (Aminosäure 63/66 - 210) gefunden wurde, was mit der Lokalisierung eines aktiven Cysteins bei Aminosäure 222 (s.o.) allerdings nicht ganz übereinstimmt. Andererseits könnte man vermuten, daß ein modifiziertes Cystein-222 die Schnittstelle blockierte und stattdessen in Position 225 geschnitten wurde, was allerdings mit der hier angewandten Methode nicht feststellbar wäre.

*Fluoresceinisothiocyanat* (FITC) erbrachte ähnliche Ergebnisse, allerdings war die Anzahl eingeführter Reste höher (1.5 beim 55 kDa Peptid, 2 bis 2.5 beim 59 kDa Peptid) und die Reaktion verlief noch unspezifischer.

## 3.2. BIOPHYSIK MODIFIZIERTER PHYTOCHROME

Im bisherigen Teil dieser Arbeit waren Methoden zur gezielten Darstellung und zur Charakterisierung modifizierter Phytochromspecies vorgestellt worden. Hierdurch wurden die Grundlagen geschaffen, die spezifischen Eigenschaften der erhaltenen Produkte und insbesondere auch die Einflüsse von abgestuften Eingriffen in die Proteinstruktur auf die Photokonversion näher zu untersuchen und somit Hinweise auf den *Mechanismus* der Protein-Chromophor-Wechselwirkungen zu erhalten. Darüber hinaus bot die Einführung der *chemischen Sonde* FMA die Möglichkeit, Konformationsänderungen des Apoproteins *direkt*, dh. unabhängig vom Tetrapyrrol-Chromophor, nachzuweisen. Prinzipiell wäre diese Fragestellung auch auf molekularer Ebene, dh. durch Modifizierung des betreffenden Gens, *in vitro* Translation und Rekonstitution des Chromoproteids, lösbar; aufgrund der doch ziemlich komplexen Struktur nativen Phytochroms ist dies bis heute allerdings noch nicht einmal ansatzweise gelungen.

Die Bedeutung von konformativen Änderungen des Apoproteins für die Photokonversion wurde in den vorangegangenen Abschnitten vor allem in Hinblick auf spektrale und Reaktivitätsunterschiede zwischen  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Form diskutiert. Da die lichtinduzierte  $P_{fr}$ -Bildung bei Raumtemperatur jedoch innerhalb von  $< 0.1$  s abläuft, ist es mit üblichen absorptionsspektroskopischen Methoden nur möglich, das Ausgangs- und das Endprodukt zu erfassen. Die bei dieser Reaktion auftretenden Zwischenstufen konnten aber durch zwei unabhängige, prinzipiell verschiedene Verfahren, nämlich *Tieftemperatur-* und *Laserblitz-Absorptionsspektroskopie*, charakterisiert werden, wobei wiederum der Einfluß der Proteinkomponente auf die spektralen Eigenschaften des Tetrapyrrol-Chromophors bzw. der chemischen Sonde FMA im Vordergrund stand.

### 3.2.1. TIEFTEMPERATUR-ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Die erste (klassische) Möglichkeit, Zwischenstufen zu erfassen, besteht darin, durch sehr niedrige Temperaturen die Photokonversion so stark zu verlangsamen, daß einzelne Intermediate "eingefroren" werden, dh. daß die Reaktion an der entsprechenden Stelle zum Stillstand kommt. Diese Methode war von YOSHIZAWA und WALD bereits 1963 erfolgreich auf *Rhodopsin* angewandt worden.

Empirisch findet man, daß ein Zusammenhang zwischen Reaktionszeit und Aktivierungsenergie besteht (HOPPE et al., 1982), dh. je schneller ein Intermediat gebildet wird, um so niedriger wird die zu überwindende Energieschwelle und um so tiefere Temperaturen sind zum Anhalten der entsprechenden Reaktion erforderlich (Fig. 12). Die gleiche Beobachtung wurde für Phytochrom bereits in den sechziger Jahren bei ersten derartigen Untersuchungen gemacht (LINSCHITZ und KASCHE, 1967; CROSS et al., 1968). Aus diesem Grund konnten durch Belichtung von  $P_r$  bei zunehmend höheren Temperaturen nacheinander die bei der  $P_{fr}$ -Bildung auftretenden Zwischenstufen charakterisiert werden (Fig. 12). Der jeweilige Umsatz wurde hierbei anhand der Weiterreaktion, dh. anhand der Menge gebildeten  $P_{fr}$ 's, bestimmt und hieraus die Absorptionsspektren der reinen Intermediate berechnet.

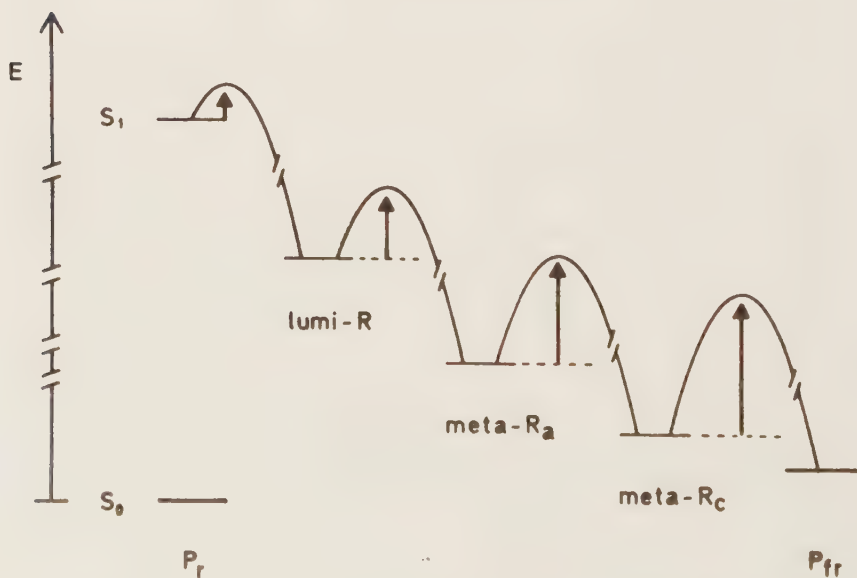


Fig. 12 : Schematische Darstellung der lichtinduzierten Umwandlung von  $P_r$  zu  $P_{fr}$  über 3 Intermediate; die Abszisse stellt die Reaktionskoordinate dar, die Ordinate die fiktive (dh. bisher in der Literatur nicht beschriebene) Aktivierungsenergie in relativen Einheiten (vgl. Text)

### 3.2.1.1. Primärer Photoprozeß

Auf der Grundlage der Arbeit von P.G. EILFELD und RÜDIGER (1985), die alle bei der Photokonversion von nativem Phytochrom auftretenden Intermediate anhand ihrer Absorptionsspektren zwischen 300 und 800 nm, ihrer Oscillatorstärken und ihrer molaren Extinktionskoeffizienten charakterisiert hatte, war es nunmehr möglich, auch chemisch modifizierte Intermediate näher zu untersuchen. Besondere Bedeutung wurde dabei im Rahmen der vorliegenden Arbeit dem *Primär-Photoprozeß*, dh. der Bildung von lumi-R, dem ersten nachweisbaren Intermediat, zugemessen.

Hierzu wurden Lichtstrom-Effekt-Kurven der lichtabhängigen lumi-R-Bildung bzw. der Rückbildung von  $P_r$  (Fig. 13) nach der Methode von van LIEW (1967) analysiert wie unter 2.4.1.4. beschrieben. Wie Fig. 14 exemplarisch zeigt, ergab sich hierbei, daß keine direkte lineare Darstellung der entsprechenden logarithmierten Kurven möglich war und der Primärprozeß mindestens zwei parallele Photogleichgewichte beinhaltete. Aus diesem Grund wurden analoge mathematische Zerlegungen für Photokonversionskinetiken bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt (Tab. 5). Hierbei erwiesen sich die relativen Anteile der reaktiveren bzw. der weniger reaktiven Komponente als deutlich temperaturabhängig.

Darüber hinaus wurde die *Quantenausbeute* der Photokonversion aus der Anfangssteigung der erhaltenen Lichtstrom-Effekt-Kurven berechnet (vgl.a. 2.4.1.4.). In Analogie zu Fig. 13 wird auch aus Tab. 5 deutlich, daß die erhaltenen Werte mit steigender Temperatur zunahmen. Aus der ARRHENIUS-Darstellung ergaben sich die korrespondierenden Aktivierungsenergien zu  $3.6 \pm 0.5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  für die Bildung von lumi-R bzw.  $5.7 \pm 0.7 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  für die Rückbildung von  $P_r$  (Ähnliche Werte wurden später auch für 114 kDa Erbsenphytochrom erhalten; SASAKI et al., 1986). In jüngster Zeit wurde von HEIHOFF et al. (1987) gefunden, daß die Quantenausbeute der Primärreaktion weitaus höher ist, als für die Bildung von  $P_{fr}$  bestimmt. Dies wurde als Dunkelreversion eines oder mehrerer Intermediate interpretiert, was zur Folge hätte, daß die im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Berechnungsgrundlage verwendeten molaren Extinktionen der Intermediate (P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985) unter Umständen zu hoch liegen. Für die Bestimmung der Aktivierungsenergie des Primärprozesses ist dies jedoch völlig unerheblich, da sich die Quantenausbeuten gemäß Gleichung (I) gleichsinnig ändern würden, was lediglich eine Verschiebung der ARRHENIUS-Funktion bei gleicher Steigung bewirken würde.

TAB. 5 : TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER LUMI-R-BILDUNG BEI 124 kDA PHYTOCHROM

A) PHOTOKONVERSION VON  $P_r$  BEI EINER ANREGUNGSWELLENLÄNGE VON 661 NM

| T in K | lumi-R-<br>menge<br>in % a) | $\phi_{r, 661}$ | $\phi_{l, 661}$ | Reaktivität c)        |                        |
|--------|-----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|------------------------|
|        |                             | b)              | b)              | erste Kom-<br>ponente | zweite Kom-<br>ponente |
| 119    | 33.0                        | 0.009           | 0.030           | 2.6 (56)              | 25 (44)                |
| 122    | 33.2                        | 0.011           | 0.035           | 2.6 (46)              | 24 (54)                |
| 133    | 34.3                        | 0.012           | 0.038           | 2.4 (39)              | 19 (61)                |
| 140    | 31.0                        | 0.016           | 0.057           | 7.1 (39)              | 48 (61)                |
| 142    | 29.0                        | 0.017           | 0.070           | 4.6 (20)              | 32 (80)                |
| 145    | 31.0                        | 0.016           | 0.060           | 6.6 (27)              | 45 (73)                |
| 153    | 32.3                        | 0.017           | 0.058           | 3.2 (21)              | 25 (79)                |
| 155    | 29.1                        | 0.022           | 0.087           | 3.6 ( 5)              | 43 (95)                |

B) PHOTOKONVERSION VON LUMI-R BEI EINER ANREGUNGSWELLENLÄNGE VON 698 NM

| T in K | lumi-R-<br>menge<br>in % a) | $\phi_{l, 698}$ | Reaktivität c)        |                        |
|--------|-----------------------------|-----------------|-----------------------|------------------------|
|        |                             | b), d)          | erste Kom-<br>ponente | zweite Kom-<br>ponente |
| 119    | 16.0                        | 0.013           | 2.1 (69)              | 48 (31)                |
| 122    | 17.7                        | 0.010           | 2.4 (65)              | 20 (35)                |
| 133    | 13.9                        | 0.016           | 2.8 (63)              | 33 (37)                |
| 140    | 11.8                        | 0.023           | 4.8 (61)              | 52 (39)                |
| 142    | 9.6                         | 0.029           | 4.0 (47)              | 32 (53)                |
| 153    | 11.5                        | 0.035           | 5.4 (28)              | 34 (72)                |
| 155    | 7.1                         | 0.039           | 5.5 (35)              | 45 (65)                |

Extrapoliert man die erhaltenen Geraden, so ergibt sich, daß deutlich unterhalb von 77 K bei der Anregung mit üblichen Lichtquellen kein lichtinduzierter Primärprozeß mehr möglich sein sollte. Dies konnte durch neuere spektroskopische Untersuchungen in einem Temperaturbereich zwischen 1.2 und 120 K bestätigt werden (P.G. EILFELD, P.H. EILFELD und F.-W. DEEG, unveröffentlicht). Absorptionsmessungen ergaben hierbei bereits bei 15 K trotz intensiver Laser-Bestrahlung (He-Ne-Laser, 632 nm) keinerlei Hinweise auf eventuell ablaufende Photoreaktionen. Es treten also keine Abweichungen vom ARRHENIUS-Verhalten auf, insbesondere auch keine Tunneleffekte.

#### Deuterierung von nativem Phytochrom

Nach der Analyse grundlegender Aspekte der Photokonversion nativen Phytochroms stellte sich zunächst die Frage nach der *Mechanistik* der ablaufenden Prozesse. Aus diesem Grund sollte anhand von Deuterierungsexperimenten eine Entscheidung versucht werden, ob es sich beim Primärprozeß der Photoreaktion um einen Protonentransfer (postuliert von SONG et al., 1974) oder um eine Z-E-Isomerisierung (RÜDIGER et al., 1985) handelt, da nur im ersten Fall eine Beeinflussung durch die Einführung des schwereren Isotops  $^2\text{H}$  zu erwarten wäre.

Tab. 5 : Fortsetzung

---

a) Molenbruch lumi-R nach 900 s sättigender Belichtung, berechnet mit Hilfe von  $\epsilon_{667}(\text{P}_r) = 140\,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  und  $\epsilon_{694}(\text{lumi-R}) = 190\,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  nach P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985); b) Berechnung und Auswertung vgl. 2.4.1.4.; verwendet zur Berechnung der Aktivierungsenergie; c) entspricht der negativen Steigung der halblogarithmischen Kinetik, erhalten durch Anwendung der "Peeling-Methode" (van LIEW, 1967) in  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , nur berechnet für Kurven mit mindestens 20 Punkten; die erste Komponente ist die weniger reaktive, die zweite Komponente die reaktivere (vgl. 2.4.1.4.); relativer Anteil der jeweiligen Komponente in Klammern; d) aufgrund einer nur teilweisen Überlappung des Anregungslichtes mit dem Absorptionsmaximum von lumi-R sind die berechneten Werte systematisch zu niedrig

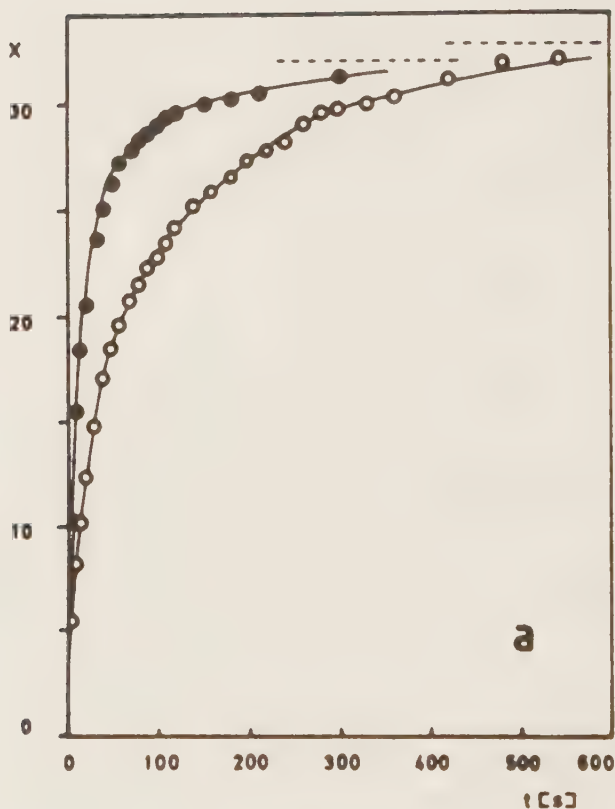
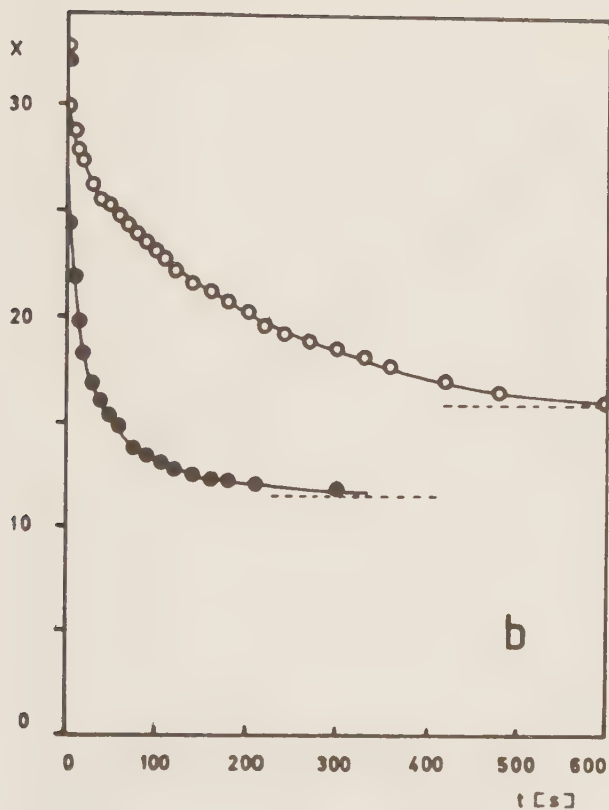


Fig. 13 : Bildung und Zerfall von lumi-R: Dosis-Effekt-Kurven bei tiefen Temperaturen (in 66 % Glycerinpuffer); die Ordinate bezeichnet den anhand der molaren Extinktionskoeffizienten aus P.G. EILFELD und RÜDIGER (1985) berechneten prozentualen Anteil von lumi-R (vgl. Text), die gestrichelten Linien die extrapolierte Menge lumi-R nach sättigender Belichtung (Tab. 5)



- a) Anregung von  $P_r$  mit 661 nm ( $30 \times 10^{18}$  Quanten  $\times m^{-2} s^{-1}$ ) bei 155 K (●) und bei 119 K (○)
- b) Anregung von durch sättigende Rotlichtbestrahlung aus  $P_r$  gebildetem lumi-R mit 698 nm ( $22 \times 10^{18}$  Quanten  $\times m^{-2} s^{-1}$ ) bei 155 K (●) und bei 119 K (○)

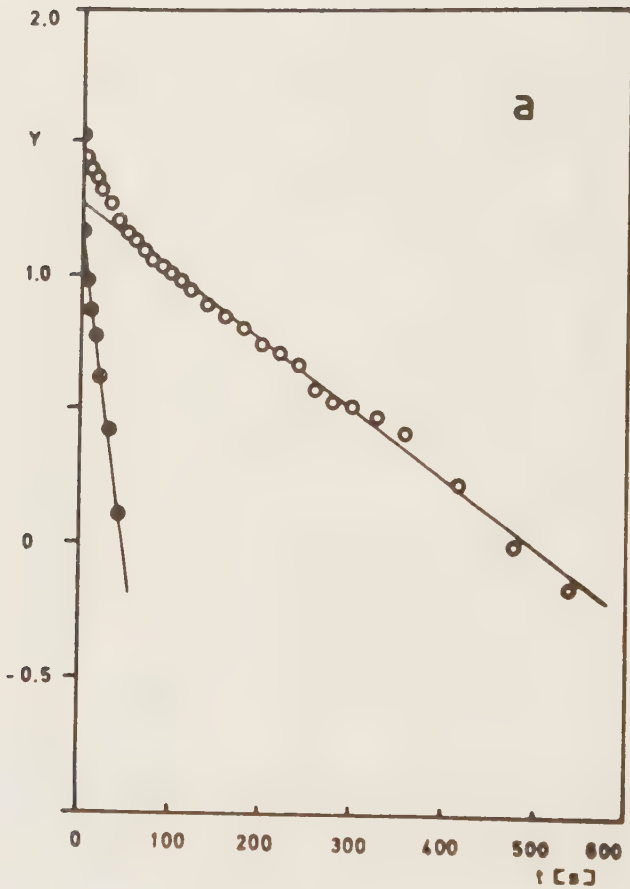
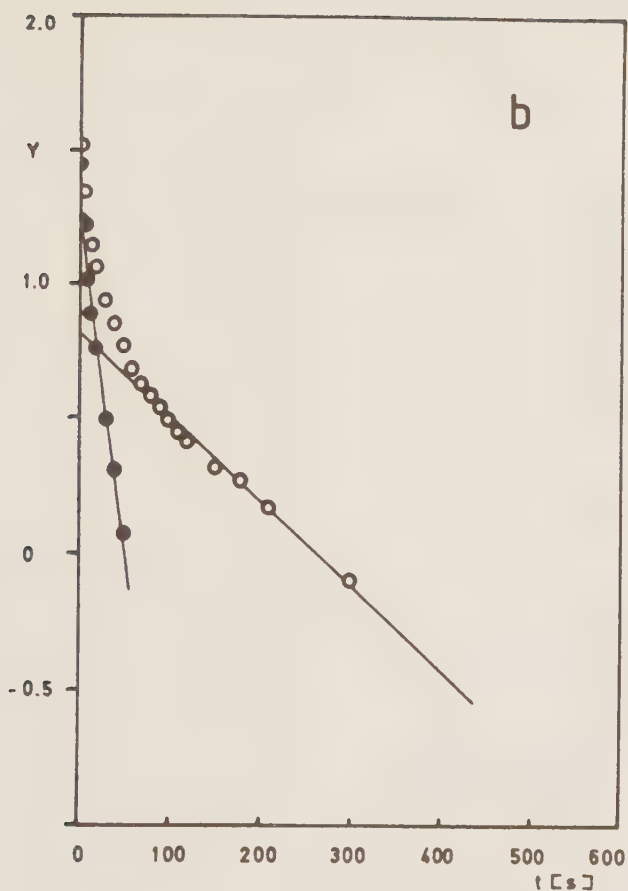


Fig. 14 : Semilogarithmische Darstellung der Dosis-Effekt-Kurven aus Fig. 13 am Beispiel der Anregung von  $P_T$  mit 661 nm bei 119 K (a) und 155 K (b); die Abszisse bezeichnet die Belichtungszeit, die Ordinate ist  $Y = {}^{10}\log | X(\infty) - X(t) |$ , wobei  $X(\infty)$  der Molenbruch lumi-R nach Langzeitbelichtung ist (Tab. 5);



gemessene Werte (o) und reaktivere Komponente (●), berechnet nach dem "Peeling"-Verfahren von van LIEW (vgl. 2.4.1.4. und Text); angegeben sind ebenso die Ausgleichsgeraden (nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate) für die reaktivere und die weniger reaktive Komponente

Anders als bei degradierten Species (SARKAR und SONG, 1981) bewirkte der Übergang von protoniertem zu deuteriertem Puffer (vgl.a. Tab. 1) bei 124 kDa Phytochrom keinerlei Änderungen der Absorptionsspektren, der Quantenausbeute der Phototransformation oder der Lage des Photogleichgewichtes, und zwar gleichgültig, ob die Reaktion bei Raumtemperatur oder bei 277 K durchgeführt worden war (Tab. 6). In Lösungen von 66 % (OD)<sub>3</sub>-Glycerin in deuteriertem Puffer wurde bei Raumtemperatur ebenfalls nur eine geringe hypsochrome Verschiebung der langwelligen Absorptionsbanden von P<sub>r</sub> bzw. P<sub>fr</sub> (jeweils 2 nm) verglichen mit dem entsprechenden protonierten Medium gefunden. Die Quantenausbeute wurde durch diese Transformation nicht beeinflusst. Fig. 15 zeigt die erhaltenen Kinetiken im Vergleich zu FDNB-gebleichtem Phytochrom, das trotz unterschiedlichem Endprodukt ebenfalls annähernd die gleiche Quantenausbeute für die Hinreaktion aufwies.

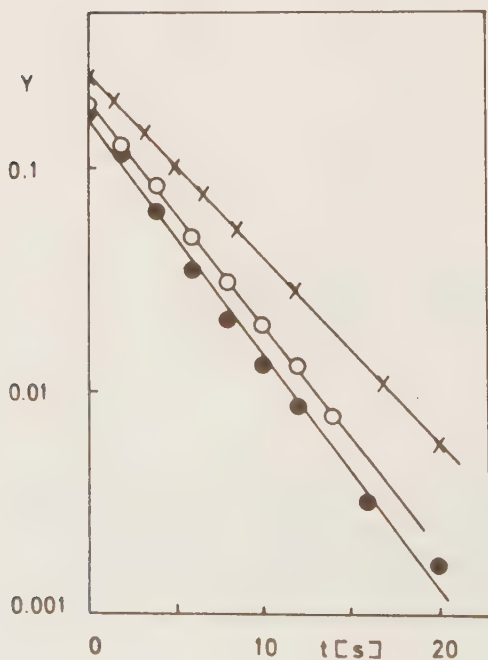


Fig. 15 :  
Semilogarithmische Darstellung der Photokonversion von P<sub>r</sub> nach Anregung mit 661 nm ( $30 \times 10^{18}$  Quanten m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) bei 290 K in 66 % Glycerinpuffer; die Abszisse bezeichnet die Belichtungszeit, die Ordinate ist  $Y = A_{730}(\infty) - A_{730}(t)$ ; protonierter (o) und deuterierter (●) Puffer; die Ausgleichsgeraden wurden nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate bestimmt (Steigung  $^{10} \log Y$  vs.  $t = -0.100 \pm 0.002$  pro s in protoniertem,  $-0.104 \pm 0.004$  in deuteriertem Glycerinpuffer); zum Vergleich ist auch die P<sub>bl</sub>-Bildung bei FDNB-modifiziertem Phytochrom (x) angegeben; hier ist  $Y = |A_{655}(\infty) - A_{655}(t)|$  (Steigung: 0.080 pro s)

TAB. 6 : ISOTOPENABHÄNGIGKEIT DER LUMI-R-BILDUNG BEI  
124 kDA PHYTOCHROM

A) PHOTOKONVERSION VON  $P_r$  BEI EINER ANREGUNGSWELLENLÄNGE VON 661 NM

| T<br>in K | Iso-<br>top<br>a) | lumi-R-<br>menge<br>in % b) | $\phi_{r, 661}$<br>b) | $\phi_{r, 661}$    |                    | Reaktivität b)        |                        |
|-----------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
|           |                   |                             |                       | (D <sub>2</sub> O) | (H <sub>2</sub> O) | erste Kom-<br>ponente | zweite Kom-<br>ponente |
| 123       | <sup>1</sup> H    | 33.0                        | 0.011                 |                    |                    | 2.6 (46)              | 24 (54)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 27.5                        | 0.015                 | 1.4                |                    | 3.8 (35)              | 33 (65)                |
| 140       | <sup>1</sup> H    | 31.0                        | 0.015                 |                    |                    | 7.1 (39)              | 48 (61)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 29.5                        | 0.023                 | 1.5                |                    | 5.7 (25)              | 62 (75)                |
| 142       | <sup>1</sup> H    | 29.0                        | 0.017                 |                    |                    | 4.6 (20)              | 32 (80)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 25.5                        | 0.023                 | 1.4                |                    | 7.7 (20)              | 78 (80)                |
| 155       | <sup>1</sup> H    | 29.0                        | 0.022                 | 1.4                |                    | 3.6 ( 5)              | 43 (95)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 22.0                        | 0.031 c)              |                    |                    | - ( 0)                | 54 (100)               |

B) PHOTOKONVERSION VON LUMI-R BEI EINER ANREGUNGSWELLENLÄNGE VON 698 NM

| T<br>in K | Iso-<br>top<br>a) | lumi-R-<br>menge<br>in % b) | $\phi_{l, 698}$<br>b) | $\phi_{l, 698}$    |                    | Reaktivität b)        |                        |
|-----------|-------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
|           |                   |                             |                       | (D <sub>2</sub> O) | (H <sub>2</sub> O) | erste Kom-<br>ponente | zweite Kom-<br>ponente |
| 122       | <sup>1</sup> H    | 18.0                        | 0.010                 |                    |                    | 2.4 (65)              | 20 (35)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 10.5                        | 0.018                 | 1.8                |                    | 2.7 (61)              | 29 (39)                |
| 142       | <sup>1</sup> H    | 9.5                         | 0.029                 |                    |                    | 4.0 (47)              | 32 (53)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 6.5                         | 0.038                 | 1.3                |                    | 4.2 (35)              | 36 (65)                |
| 155       | <sup>1</sup> H    | 7.5                         | 0.039                 |                    |                    | 5.5 (35)              | 45 (65)                |
|           | <sup>2</sup> D    | 3.0                         | 0.062                 | 1.6                |                    | 3.9 (28)              | 64 (72)                |

a) gemessen mit jeweils identischen Phytochrompräparationen, vgl. 2.4.1.1.;

b) vgl. entsprechende Anmerkungen zu Tab. 5; c) Aufgrund einer teilwei-  
sen Dunkelreaktion von lumi-R zu meta-R<sub>a</sub> ist die aus  $\Delta A_{698}$  berechnete  
Quantenausbeute  $\phi_{l, 661}$  systematisch zu niedrig; deshalb wurde ein korri-  
gierter Wert für  $\phi_{r, 661}$  anhand von  $\Delta A_{661}$  berechnet, wobei  $\epsilon_{661}(\text{lumi-R}) =$   
 $\epsilon_{661}(\text{meta-R}_a) = 85\,000 \times 1 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985)

Es wurde allerdings erwartet, daß bei tiefen Temperaturen Änderungen auftreten könnten. Die Photokonversionskinetiken in deuteriertem Puffer wurden deshalb ebenfalls einer "Peeling-Analyse" (vgl.o. und 2.4.1.4.) unterzogen. Auch in diesem Fall ergaben sich so mindestens zwei Teilprozesse, wobei im Vergleich zur protonierten Probe der Anteil der jeweils reaktiveren Komponente durch Deuterierung erhöht wurde. Der Anteil an gebildetem lumi-R im Photogleichgewicht nahm ab, dh. die Photoreversion von lumi-R zu  $P_r$  ist in  $D_2O$  offensichtlich eher möglich als in  $H_2O$ . Für die Aktivierungsenergie konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (lumi-R-Bildung:  $3.6 \pm 0.5 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  in protoniertem,  $3.2 \pm 0.7 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  in deuteriertem Puffer;  $P_r$ -Rückbildung:  $5.7 \pm 0.7 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$  bzw.  $6.2 \pm 1.2 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ ).

#### Modifizierung mit Fluor-2,4-dinitrobenzol (FDNB) und 8-Anilino-1-naphthalinsulfonsäure (ANS)

Um den Einfluß der Apoprotein-Komponente auf die Photokonversion nativen Phytochroms zu untersuchen, sind Deuterierungsexperimente ungeeignet, da eine direkte Einwirkung auf den Chromophor nicht ausgeschlossen werden kann. Hierzu sind vielmehr kovalente Modifizierungen des Proteins erforderlich. Durch die Wahl geeigneter Reagentien konnten dabei im vorliegenden Fall abgestuft modifizierte Spezies mit zunehmend eingeschränkter Photoreversibilität dargestellt werden. Während bei Austausch von Wasserstoff gegen Deuterium die Photokonversion bei Raumtemperatur praktisch ungestört ablief, konnten durch die Einführung von immer mehr FDNB-Resten alle Übergänge vom System  $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$  bis zum ebenfalls (allerdings nur eingeschränkt) photoreversiblen System  $P_{660} \rightleftharpoons P_{b1}$  erhalten werden. Bei Einlagerung von ANS schließlich war nur noch die Bildung von  $P_{660} \rightleftharpoons P_{b1}$  möglich (Tab. 7).

Dabei wurde bei Species, die nur zur  $P_{b1}$ -Bildung fähig waren (also bei 39 kDa oder FDNB-gebleichtem Phytochrom) lumi-R mit stets gleicher Kinetik gebildet (Fig. 16), was einen weiteren Hinweis darauf liefert, daß intensive chemische Modifizierung ebenso wie Proteolyse spezifische Protein-Chromophor-Wechselwirkungen aufheben kann. Die mathematische Analyse der erhaltenen Lichtfluß-Effekt-Kurven nach van LIEW (1967) ergab auch hier die Notwendigkeit, mindestens zwei Komponenten, dh. mindestens zwei (parallele) Wege, der lumi-R-Bildung zu fordern.

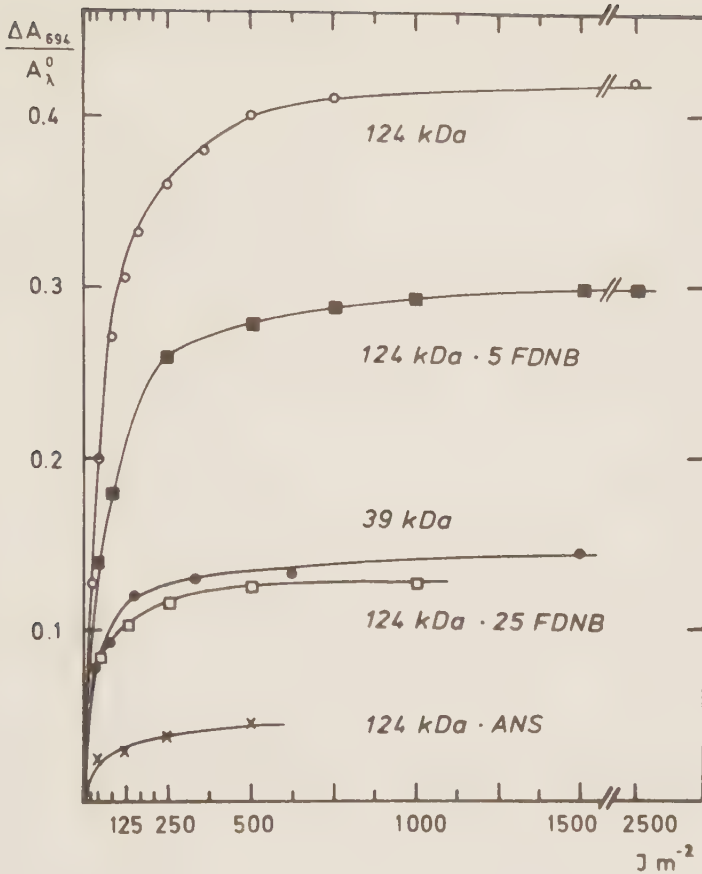


Fig. 16 : Bildung von lumi-R nach Rotlichtanregung (660 nm) der  $P_r$ -formen verschiedener Phytochromspecies bei tiefen Temperaturen in 66% Glycerinpuffer;  $A_\lambda^0$  bezeichnet die jeweils maximale  $P_r$ -Absorption vor Belichtung :

unmodifiziertes 124 kDa Phytochrom bei 140 K (o;  $\lambda = 667$  nm), 39 kDa Chromopeptid, erhalten durch tryptischen Abbau von unmodifiziertem 124 kDa Phytochrom nach REIFF et al. (1985) bei 138 K (●;  $\lambda = 660$  nm), 124 kDa Phytochrom, modifiziert mit 5 (■) bzw. 25 (□) Resten FDNB bei 153 K ( $\lambda = 665$  nm) und 124 kDa Phytochrom, gebleicht durch Umsetzung mit ca 10 mM ANS bei 146 K (x;  $\lambda = 657$  nm)

TAB. 7 : PHOTOKONVERSION FDNB- UND ANS - MODIFIZIERTER PHYTOCHROME

| T in K :                                  | Zahl gebundener FDNB <sup>a),b)</sup> |                 |        |                    | ANS in       |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------|--------------------|--------------|
| Reaktion                                  | 0                                     | 4 - 5           | ca 12  | ca 25              | Glycerin     |
| <u>HINREAKTION</u> ( $P_{fr}$ -BILDUNG) : |                                       |                 |        |                    |              |
| < 163 :                                   |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_r \longrightarrow \text{lumi-R}$       | +                                     | + d)            | +      | +                  | ±            |
| $\Delta A_{695}(\infty) : A_{660}(0)$     | 0.42                                  | $0.26 \pm 0.03$ | 0.28   | 0.13               | 0.0045       |
| $\phi (P_r \rightarrow \text{lumi-R})$ c) | 1.00                                  | 1.3             | 0.7    | 0.43               | < 0.2        |
| ca 188 :                                  |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_r \longrightarrow \text{meta-R}_a$     | +                                     | +               | +      | +                  | -            |
| $-\Delta A_{660}(\infty) : A_{660}(0)$    | 0.16                                  | 0.13            | 0.10   | 0.12               | -            |
| ca 243 :                                  |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_r \longrightarrow \text{meta-R}_c$     | +                                     | +               | +      | -                  | -            |
| $-\Delta A_{660}(\infty) : A_{660}(0)$    | 0.62                                  | 0.60            | 0.33   | 0.32 <sup>e)</sup> | -            |
| > 273 :                                   |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_r \longrightarrow P_{fr}$              | +                                     | +               | +      | -                  | -            |
| $\lambda_{\max} (P_{fr})$                 | 732 nm                                | 729 nm          | 726 nm | ( $P_{bl}$ )       | ( $P_{bl}$ ) |
| <u>RÜCKREAKTION</u> ( $P_r$ -BILDUNG) :   |                                       |                 |        |                    |              |
| < 173 :                                   |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_{fr} \longrightarrow \text{lumi-F}$    | +                                     | +               | +      | -                  | -            |
| $\Delta A_{666} : -\Delta A_{735}$        | 0.63                                  | 0.58            | 0.70   | -                  | -            |
| ca 213 :                                  |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_{fr} \longrightarrow \text{meta-F}$    | +                                     | +               | +      | -                  | -            |
| $A_{660}(\text{m.-F}) : A_{666}(P_r)$     | 0.90                                  | 0.81            | 0.64   | -                  | -            |
| > 273 :                                   |                                       |                 |        |                    |              |
| $P_{fr} / P_{bl} \longrightarrow P_r$     | +                                     | +               | +      | +                  | +            |

Der Anteil von gebildetem lumi-R im Photogleichgewicht hing allerdings in hohem Maße von den jeweils gewählten Modifizierungsbedingungen ab (Tab. 7), dh. der Prozentsatz lumi-R sank mit steigender Tendenz zur  $P_{bl}$ -Bildung. Die Quantenausbeuten der Reaktion  $P_r \rightarrow \text{lumi-R}$  nahmen im allgemeinen mit steigendem Modifizierungsgrad ab (Ausnahme: Die Modifizierung mit 3 Resten FDNB bewirkte eine Erhöhung der Quantenausbeute analog zur Deuterierung, s.o.), was entweder auf eine leicht erhöhte Aktivierungsenergie zurückgeführt werden könnte oder aber auf den präexponentiellen ARRHENIUS-Faktor, der mit der Reaktions-Entropie (und somit mit der Geometrie) korreliert ist. Trotz völlig unterschiedlicher Endprodukte ( $P_{fr}$  bzw.  $P_{bl}$ ) scheint also der Mechanismus der Primärreaktion im wesentlichen gleich zu sein und sich nur quantitativ geringfügig zu unterscheiden.

### 3.2.1.2. Folgeprozesse

Tab. 7 faßt alle untersuchten Prozesse zusammen. Außer im Falle von ANS wurde immer sowohl lumi-R als auch meta- $R_a$  gebildet. Signifikante Unterschiede traten erst auf der Stufe der meta- $R_c$  - bzw.  $P_{fr}$ -Bildung auf. So ergab sich beim Vergleich der Gesamtreaktionen, daß die Quantenausbeute der  $P_{bl}$ -Bildung bei FDNB-gebleichtem Phytochrom weniger als 20% unter der Quantenausbeute der  $P_{fr}$ -Bildung bei unmodifiziertem Phytochrom lag (Fig. 15). Schließt man aus, daß dieser hohe Grad an Übereinstimmung lediglich auf Zufall beruht (was bei Systemen dieser Komplexität sehr unwahrscheinlich wäre), kann man annehmen, daß die beobachtete Reduktion der Quantenausbeute ( $\geq 0.5$  für

Tab. 7 : Fortsetzung

---

a) in 66% Glycerinpuffer, Präparation vgl. 2.3.1.2.; Anzahl gebundener Reste bestimmt aus  $A_{350}$ ; b) bei der untersuchten Temperatur keine (-) oder stark eingeschränkte ( $\pm$ ) Reaktion; c) relative Quantenausbeute, bezogen auf unmodifiziertes Phytochrom, bei  $143 \pm 1$  K, berechnet aus der Anfangssteigung  $\Delta A_{694}$  nach 10 s Belichtung; d) leichte Unterschiede, je nach Präparationsbedingungen; e) Extinktionsänderung beruht auf  $P_{bl}$ -Bildung, keine Bildung von meta- $R_c$

lumi-R-Bildung, 0.18 für  $P_{fr}$ -Bildung; HEIHOFF et al., 1987) in dem Abschnitt der Photokonversion eintritt, der allen untersuchten Species gemeinsam ist, das bedeutet also vor oder bei der Bildung von meta- $R_a$ .

### 3.2.1.3. Rückreaktion

In der Literatur (SPRUIT et al., 1975; RÜDIGER et al., 1985) war auch für die Rückreaktion ( $P_r$ -Bildung) eine E-Z-Isomerisierung als Primärprozeß vorgeschlagen worden. Aus diesem Grund wurde die oben beschriebene Methodik ebenso auf die lichtinduzierte Umwandlung von  $P_{fr}$  bei tiefen Temperaturen angewandt. Fig. 17 zeigt die Bildung von lumi-F, dem ersten nachweisbaren Intermediat der Photokonversion von  $P_{fr}$ . Diese Reaktion verlief nahezu aus-

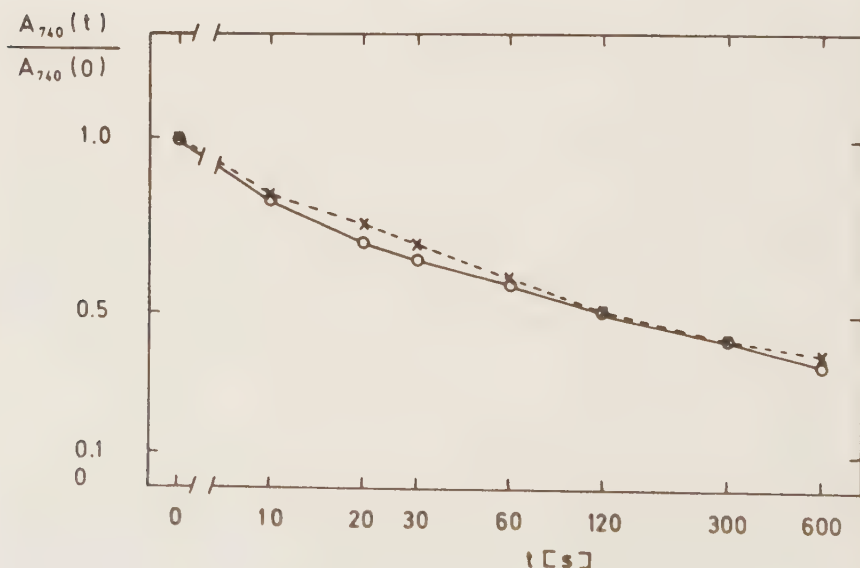


Fig. 17 : Bildung von lumi-F aus  $P_{fr}$  bei 143K in 66% Glycerinpuffer nach Anregung mit dunkelrotem Licht (Kantenfilter RG 715), verfolgt anhand der Abnahme der  $P_{fr}$ -Absorption (logarithmische Zeitskala): protonierter (- - -) und deuterierter (—) Puffer; vgl.a. Fig. 13

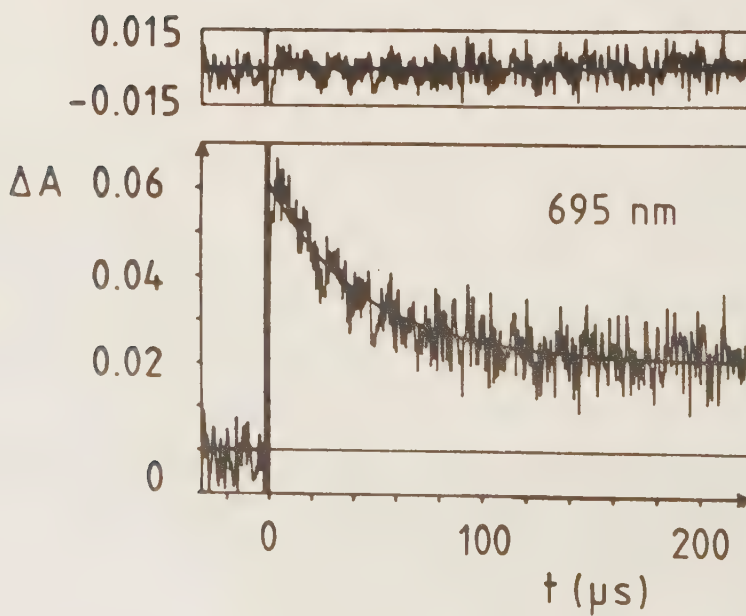
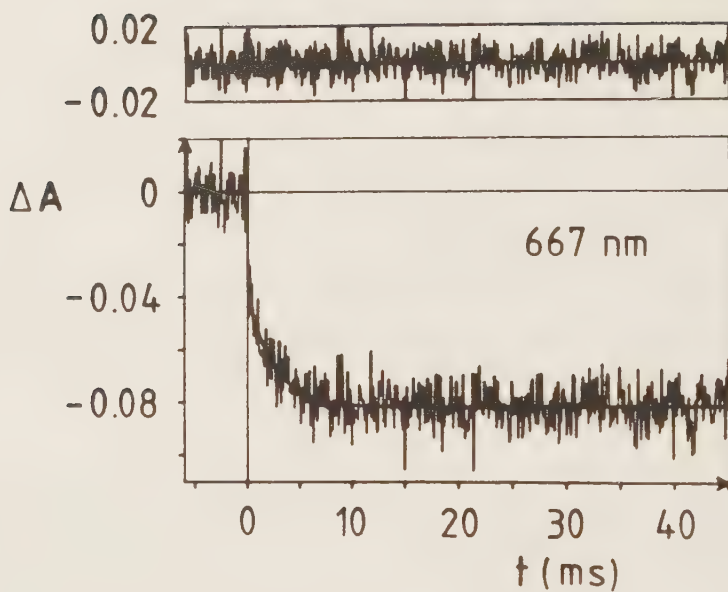
schließlich in einer Richtung, dh. es lag kein Photogleichgewicht vor, und eine kinetische Analyse nach BUTLER (1972; vgl. 2.4.1.4.) war somit nicht möglich. Falls es sich bei der lumi-F-Bildung tatsächlich um eine unidirektionale Reaktion handeln sollte, wäre eine lineare  $P_{fr}$ -Abnahme in Abhängigkeit vom Lichtfluß zu erwarten (HOPPE et al., 1982); dies konnte allerdings nicht bestätigt werden. Die komplizierte Lichtfluß-Effekt-Kurve (Fig. 17) ließ sich jedoch durch Überlagerung von  $\geq 10$  unterschiedlichen Einzelprozessen erzeugen. Dies würde bedeuten, daß (im Extremfall) ein Kontinuum von  $P_{fr}$ -Populationen unterschiedlicher Reaktivität vorliegt, das z.B. durch Einfrieren unterschiedlicher Konformen entstanden sein könnte. Wie oben erwähnt, waren ähnliche Beobachtungen beim Primärprozeß gemacht worden, die den Schluß nahelegten, mindestens zwei Populationen für die Reaktion  $P_r \rightleftharpoons \text{lumi-R}$  zu fordern.

Auch im Falle der Rückreaktion wurde weder ein Isotopeneffekt beim Austausch von H gegen D gefunden, noch bewirkte geringe Modifizierung mit FDNB ( $\leq 3$  Reste) Änderungen der Reaktivität. Erst bei FDNB-gebleichtem Phytochrom, das nur noch zur Bildung von  $P_{b1}$  fähig war, konnte weder lumi-F, noch das folgende Intermediat meta-F gefunden werden (Tab. 7). Diese deutet darauf hin, daß die Bildung von  $P_{660}$  aus  $P_{b1}$  offensichtlich nach einem anderen Mechanismus erfolgt.

### 3.2.2. LASERBLITZ-ABSORPTIONSSPEKTROSKOPIE

Anstatt nun einzelne Teilreaktionen der  $P_{fr}$ -Bildung durch tiefe Temperaturen anzuhalten, besteht alternativ die Möglichkeit, zwar die Gesamtreaktion ungestört ablaufen zu lassen, jedoch sowohl die Anregung als auch die Meßzeit so kurz zu wählen, daß einzelne Zwischenstufen noch vor ihrer Weiterreaktion erfaßt werden können. Bei zunehmender Länge der Meßintervalle konnten auf diese Weise nacheinander alle Intermediate erhalten werden. Der jeweilige Umsatz wurde analog zu den Tieftemperaturabsorptionssmessungen auch hier anhand des Endproduktes, dh. anhand der  $P_{fr}$ -Menge nach  $> 1$  s bestimmt.

Diese Methode hat den Vorteil, den in der lebenden Pflanze gegebenen Bedingungen beträchtlich näher zu kommen, da die Messung bei Raumtemperatur und in flüssigem wässrigen Medium durchgeführt werden kann.

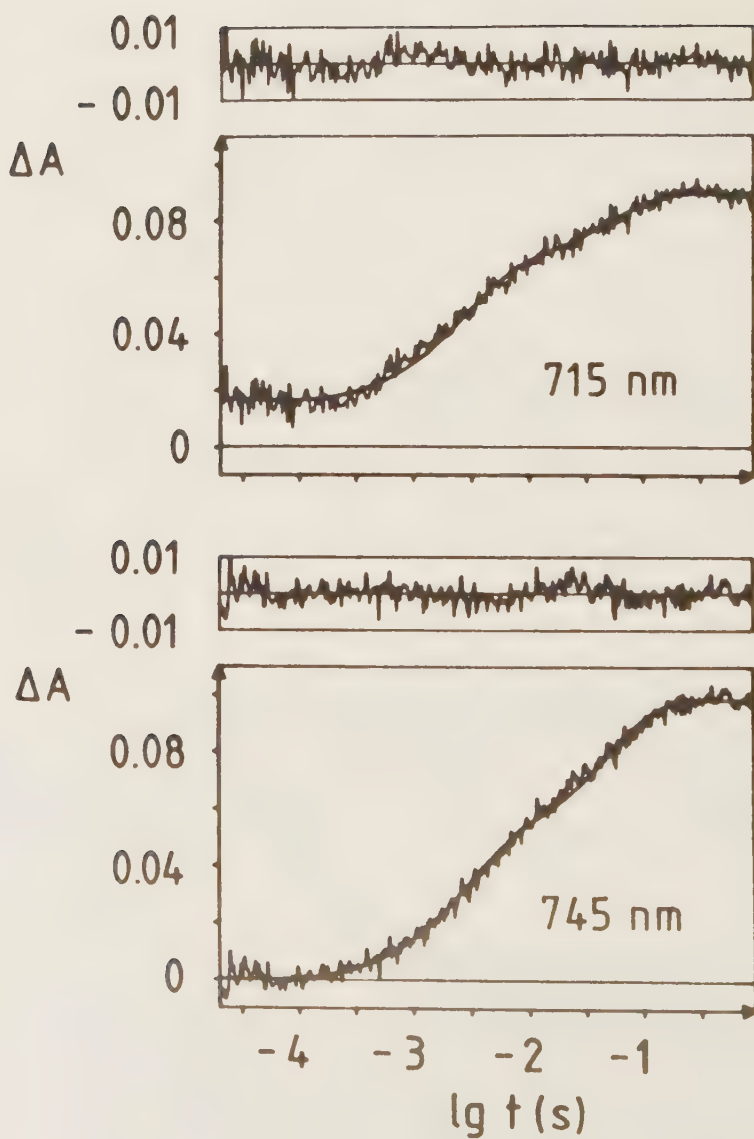


### 3.2.2.1. Kinetik der Photokonversion von $P_r$

Nachdem mit Hilfe der Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie die Charakterisierung der bei der  $P_{fr}$ -Bildung auftretenden Intermediate gelungen war, sollte nunmehr der Zeitverlauf der hieran beteiligten Reaktionen genauer betrachtet werden. Der Mechanismus der Photokonversion isolierter Phytochrome war schon seit längerem mit Hilfe von Elektronenblitz- (LINSCHITZ et al., 1966; LINSCHITZ und KASCHE, 1967) bzw. Laserblitz-Experimenten untersucht worden (BRASLAVSKY et al., 1980; SHIMAZAKI et al., 1980; CORDONNIER et al., 1981; PRATT et al., 1982, 1984; RUZSICKA et al., 1985). Allerdings war hierbei bisher nur in einem Fall undegradiertes Phytochrom mit intakter Protein-Komponente eingesetzt worden (RUZSICKA et al., 1985). Außerdem wurde in der betreffenden Arbeit nur der Zerfall des ersten Intermediates bei der  $P_{fr}$ -Bildung ( $\text{lumi-R} = "I_{700}"$  in RUZSICKA et al.) untersucht. Nun waren aber bereits bei der Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie signifikante Unterschiede zwischen den Photokonversions-Mechanismen nativen und degradierten Phytochroms gefunden worden, während sich isoliertes 124 kDa Phytochrom wie Phytochrom *in vivo* verhielt (P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985). Darüber hinaus wichen die für die  $P_{fr}$ -Bildung angegebenen Geschwindigkeitskonstanten deutlich voneinander ab (LINSCHITZ et al., 1966:  $0.26 \text{ s}^{-1}$  bei 273.6 K, CORDONNIER et al., 1981:  $15 \text{ s}^{-1}$  bzw.  $2.8 \text{ s}^{-1}$  bei 275 K).

Aus diesen Gründen erschien es notwendig, den vorgeschlagenen Mechanismus paralleler Wege der  $P_{fr}$ -Bildung (FURUYA, 1983) anhand von reinem 124 kDa Phytochrom zu überprüfen, bevor weitergehende Untersuchungen in Angriff genommen werden konnten. Nicht zuletzt versprach dies auch Hinweise darauf,

Fig. 18 : Absorptionsänderungen nach Laserblitzanregung von  $P_r$  mit Rotlicht (660 nm, 1 mJ) bei 298 K; die berechnete exponentielle Zerfallskurve (vgl. 2.4.2.2.) wurde ebenfalls dargestellt; die Kurven oberhalb der Zerfallskinetiken stellen die entsprechende Differenz zwischen experimenteller und berechneter Zerfallskurve dar; für  $\lambda = 667 \text{ nm}$  beträgt die exponentielle Zerfallsrate  $390 \text{ s}^{-1}$ ,  $A_{667}(0) = 0.42$ , für  $\lambda = 695 \text{ nm}$   $28\,000 \text{ s}^{-1}$ ,  $A_{667}(0) = 0.57$



ob es sich bei der *in vivo* beobachteten Heterogenität der  $P_{fr}$ -Bildung (INOUE und FURUYA, 1985) um eine spezifische Eigenschaft des Phytochrom-Proteids selbst handelt oder eher um eine Folge unterschiedlicher Umgebungen, wie dies auch in der lebenden Pflanzenzelle denkbar ist.

Im folgenden soll nun kurz die Analyse der  $P_r \rightarrow P_{fr}$  Photokonversion für 124 kDa Phytochrom skizziert werden, deren Bestimmung (nicht zuletzt aufgrund zahlreicher Widersprüche in der Literatur, s.o.) absolut notwendig war, um einheitliche Bezugsgrößen zur Untersuchung modifizierter Phytochrome zu erhalten. Tab. 8 faßt die wesentlichsten Ergebnisse zusammen. Für kurze Zeiten ( $< 100 \mu s$ ) wurde insbesondere bei 695 nm der Zerfall von lumi-R mit einer Rate von  $25\,000\ s^{-1}$  beobachtet. Die von RUZSICKSKA et al. (1985) beschriebene zweite Zerfallskomponente ( $250\,000\ s^{-1}$ ) konnte allerdings aus experimentellen Gründen nicht erfaßt werden.

Während diese Ergebnisse noch in Einklang mit der Literatur stehen, traten bei längeren Zeiten Differenzen auf. Nach  $> 1\ ms$  wurde zunächst meta- $R_c$  mit einer typischen Bleichung bei 667 nm und einer Rate von  $330\ s^{-1}$  gebildet (Fig. 18). Der Aufbau der langwelligen Absorption ( $> 700\ nm$ ) erfolgte jedoch überraschender Weise ebenfalls mit dieser Zeitkonstante (Fig. 19). Die mathematische Analyse der Extinktionsänderungen (2.4.2.2.) ergab noch einen dritten Prozeß mit einer Rate von  $20\ s^{-1}$ , der allerdings ausschließlich die langwellige Absorption betraf (Tab. 8, Fig. 18 a, 19). Aus den zugehörigen Differenzspektren (nicht abgebildet) ging hervor, daß dieser Prozeß eine Extinktionserhöhung und eine Verschiebung von 720 nach 730 nm bewirkte.

Fig. 19 : Änderungen der Dunkelrotabsorption bei einer Beobachtungswellenlänge von 715 nm bzw. 745 nm nach Laserblitz-Anregung (660 nm, 1 mJ) von  $P_r$  ( $A_{667} = 0.85$ ) bei 298 K, dargestellt auf einer logarithmischen Zeitskala; die aus den gleichen Geschwindigkeitskonstanten wie in Tab. 8 berechneten Ausgleichskurven sind für beide Wellenlängen ebenfalls angegeben; die Differenz zwischen experimenteller und berechneter Kurve wurde jeweils über der zugehörigen Kinetik abgebildet (vgl. a. 2.4.2.2.)

Diese Ergebnisse konnten auch durch quantitative Betrachtungen gestützt werden. Ausgehend von einem sequentiellen Modell, das in der Lage ist, die beobachteten Extinktionsänderungen im fraglichen Zeitbereich widerspruchsfrei zu erklären, wurden die Extinktionen der beteiligten Zwischenstufen berechnet. Wie Tab. 9 zeigt, ergab sich hierbei eine gute Übereinstimmung mit den Werten, die anhand der Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie erhalten worden waren.

Eine Rückreaktion der Intermediate zur  $P_r$ -Form wurde zunächst nicht in die Rechnungen einbezogen. Aufgrund jüngster opto-akustischer Messungen (HET-HOFF et al., 1987) muß man zwar eine rasche Dunkelreversion eines oder mehrerer Intermediate annehmen, doch wurde trotzdem auf eine Korrektur der er-

TAB. 8 : KINETISCHE DATEN (GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN  $k_i$  IN  $s^{-1}$  UND PRÄEXPONENTIELLE FAKTOREN  $A_i$ ) DER PHOTOTRANSFORMATION VON 124 kDa  $P_r^a$  NACH 10 NS LASERBLITZ-ANREGUNG MIT 660 NM

| Wellenlänge<br>in nm | Absorptions-<br>änderungen |                    | Geschwindigkeitskonstanten<br>und präexponentielle Faktoren |         |               |        |               |         |
|----------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------------|---------|---------------|--------|---------------|---------|
|                      | Beginn <sup>b)</sup>       | Ende <sup>c)</sup> | $k_1$                                                       | $A_1$   | $k_2$         | $A_2$  | $k_3$         | $A_3$   |
| 667                  | -0.050                     | -0.110             | --                                                          | 0       | 390           | -0.061 | 20            | < 0.001 |
| 695                  | 0.070                      | 0.033              | 28 000                                                      | 0.043   | <sub>d)</sub> | --     | <sub>d)</sub> | --      |
| 715                  | 0.030                      | 0.090              | 28 000                                                      | 0.004   | 370           | 0.047  | 20            | 0.028   |
| 725                  | 0.015                      | 0.097              | 28 000                                                      | < 0.001 | 370           | 0.055  | 20            | 0.034   |
| 735                  | 0.0                        | 0.109              | <sub>d)</sub>                                               | --      | 370           | 0.055  | 20            | 0.054   |
| 745                  | 0.0                        | 0.099              | <sub>d)</sub>                                               | --      | 370           | 0.048  | 20            | 0.052   |

a) in 20 mM KPP, pH 7.8, mit 20 % (v/v) Glycerin;  $A_{667} (P_r) = 0.85$ ;

b) gemessen 200 ns nach Laseranregung; <sup>c)</sup> für Meßzeiten über 1 s;

d) aufgrund zu geringer Absorptionsänderungen keine exakte Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten möglich

haltenen Intermediatspektren verzichtet, da einheitliche Kriterien zur Beurteilung ihrer Genauigkeit nach wie vor fehlen. Eine Dunkelreversion würde bei der Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten Werte mit anomal hohem absoluten Betrag ergeben, da der Anteil des betreffenden Intermediats zu niedrig eingeschätzt worden wäre. Dies könnte für lumi-R durchaus zutreffen, das allerdings in Tab. 9 nicht enthalten ist.

$P_{fr}$  ist nicht der Ausgangspunkt dieser Dunkelreversion (KERSCHER, 1983; VIERSTRA und QUAIL, 1983; CHAI et al., 1987), meta- $R_c$  wohl ebensowenig, da es bereits bei  $-25^\circ\text{C}$  stabil ist. Somit verbleibt also meta- $R_a$  als re-

TAB. 9 : MOLARE EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN DER INTERMEDIATE IN  $\text{L}\times\text{MOL}^{-1}\text{CM}^{-1}$ , BERECHNET AUS LASERBLITZMESSUNGEN (298 K) UND VERGLEICHEN MIT TIEFTEMPERATUR-ABSORPTIONSSPEKTREN DER INTERMEDIATE (248 K)

| Wellenlänge<br>in nm | molare Extinktionskoeffizienten, ber. aus kinet. Daten <sup>a)</sup> |                       | molare Extinktionskoeffizienten, berechnet aus Tieftemperatur-Absorptionsspektren <sup>b)</sup> |             |          |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------|
|                      | zweites <sup>c)</sup>                                                | drittes <sup>d)</sup> | meta- $R_a$                                                                                     | meta- $R_c$ | $P_{fr}$ |
| 667                  | 79 000                                                               | 37 000                | 70 000                                                                                          | 33 000      | 33 000   |
| 715                  | 12 200                                                               | 45 300                | 11 000                                                                                          | 50 000      | 69 000   |
| 725                  | 6 900                                                                | 46 600                | 4 500                                                                                           | 48 000      | 78 000   |
| 735                  | 800                                                                  | 37 300                | 0                                                                                               | 39 000      | 83 000   |
| 745                  | -70 <sup>e)</sup>                                                    | 29 300                | 0                                                                                               | 26 000      | 73 000   |

<sup>a)</sup> unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten von KELLY und LAGARIAS (1985); <sup>b)</sup> bei 248 K in 100 mM KPP, pH 7,8, mit 66 % (v/v) Glycerin; das meta- $R_a$ -Spektrum wurde aus der Temperaturabhängigkeit zwischen 133 und 200 K extrapoliert; <sup>c)</sup> gebildet durch den Prozeß mit der Geschwindigkeitskonstante  $28\,000\text{ s}^{-1}$ ; <sup>d)</sup> gebildet durch den Prozeß mit der Geschwindigkeitskonstante  $370\text{ s}^{-1}$ ; <sup>e)</sup> nicht signifikant, da Fehlergrenze der Messung  $> \pm 1000\text{ l}\times\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$

vertierendes Intermediat. Als Extremsituation kann man annehmen, daß meta- $R_a$  mit einer Quantenausbeute von 50 % gebildet wird, meta- $R_c$  und  $P_{fr}$  hingegen mit einer Quantenausbeute von etwa 18 % (LAGARIAS et al., 1987). Dies würde auf die Form der Absorptionsspektren jedoch keinerlei qualitativen Einfluß haben, dh. man würde auch in diesem Fall ein Absorptionsmaximum um 660 nm und keines oberhalb von 700 nm finden. Allerdings würde die molare Extinktion bei 667 nm von  $79\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  auf etwa  $108\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  ansteigen. Zur Zeit gibt es jedoch keinerlei Möglichkeiten, dies genauer zu überprüfen.

### 3.2.2.2. Umgebungseinflüsse auf die Photokonversion von $P_r$

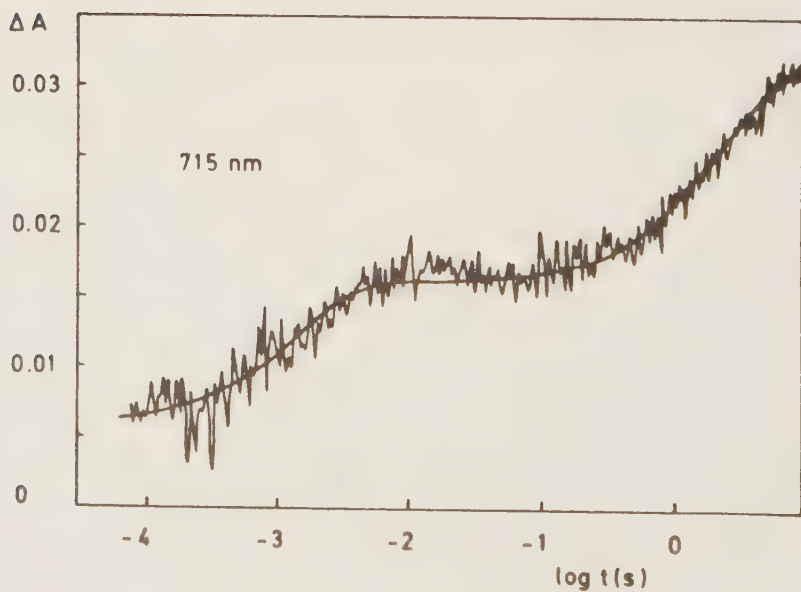
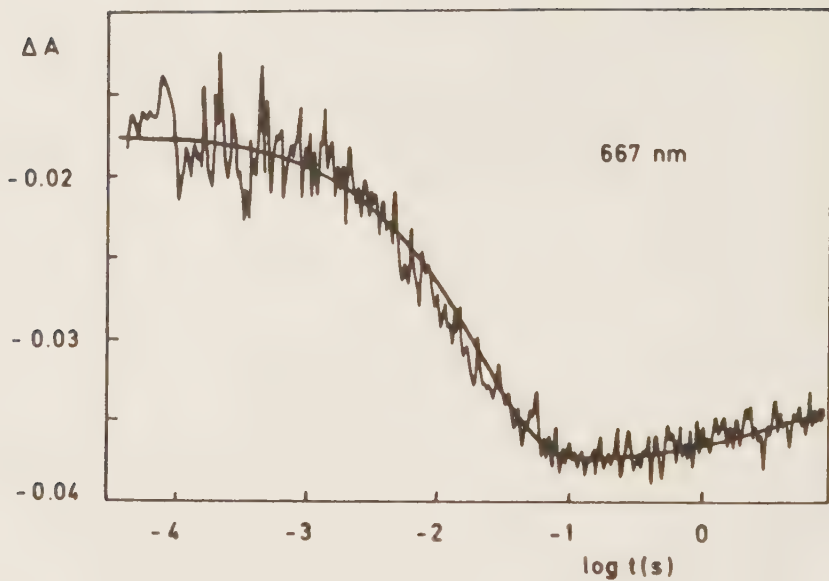
Obwohl allgemein als sicher gelten kann, daß die Photokonversion von nativem Phytochrom mit Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche verbunden ist (vgl.a. 3.1.2.2.), wurde bisher zwar postuliert (SPRUIT et al., 1975), jedoch nie bewiesen, daß der letzte Schritt, nämlich die Bildung von  $P_{fr}$  aus meta- $R_c$ , mit den umfangreichsten Proteindeformationen verbunden sei. Auch bei dieser Fragestellung war es mit Hilfe der Laserblitz-Photolyse auf einfache Weise möglich, Hinweise auf die Rolle des Apoproteins bei der Photokonversion zu erhalten, indem die Protein-Umgebung in definierter Weise verändert wurde. Solche Untersuchungen sind mit Hilfe von Tieftemperatur-Absorptionsspektroskopie nur sehr schwer möglich, da zahlreiche Reagentien bei den erforderlichen Meßtemperaturen auskristallisieren und so in unerwünschter und unkontrollierbarer Weise die Proteinumgebung verändern, was unter Umständen auch zur Denaturierung führen kann.

Als Modell für Systeme, die nicht mehr in der Lage sind,  $P_{fr}$  zu bilden, sollte ANS-modifiziertes Phytochrom ( $P_{660} \rightleftharpoons P_{b1}$ ) untersucht werden, das bei tiefen Temperaturen nicht mehr photoaktiv war (s. 3.2.1.1.). Hierbei stellte sich zunächst das Problem, daß eine quantitative Rückbelichtung zu  $P_{660}$  zwischen zwei Laserblitz-Anregungen nicht möglich war, dh. es wurde stets nur ein Gemisch aus  $P_{660}$  und  $P_{b1}$  erhalten. Die Belichtung mit 660 nm bewirkte dabei zunächst, daß mit einer Halbwertszeit von 30  $\mu\text{s}$  ein Intermediat gebildet wurde, was anhand einer deutlichen Absorptionzunahme bei 720 nm verfolgt werden konnte, die synchron von einer Absorptionsabnahme bei 660 nm um etwa den gleichen Betrag begleitet wurde.

TAB. 10 : KINETISCHE DATEN (GESCHWINDIGKEITSKONSTANTEN  $K_i$  IN  $s^{-1}$  UND PRÄEXPONENTIELLE FAKTOREN  $A_i$ ) DER PHOTOTRANSFORMATION VON  $P_r^a$  UNTER VERSCHIEDENEN BEDINGUNGEN NACH 10 NS LASERBLITZ-ANREGUNG MIT 660 NM (1 MJ)

| Probe, Bedingungen                                       | kinetische Daten                          |                  |                  |                                       |                  |                  |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------|------------------|---------------------------------------|------------------|------------------|
|                                                          | meta-R <sub>a</sub> → meta-R <sub>c</sub> |                  |                  | meta-R <sub>c</sub> → P <sub>fr</sub> |                  |                  |
|                                                          | k <sub>1</sub>                            | A <sub>667</sub> | A <sub>730</sub> | k <sub>2</sub>                        | A <sub>667</sub> | A <sub>730</sub> |
| 124 kDa in KPP                                           | 470<br>± 50                               | -50              | 72               | 11<br>± 2                             | < 1              | 25               |
| 124 kDa in Ficoll 40 000<br>(33 % m/v in KPP)            | 320                                       | -50              | 48               | 7                                     | < 1              | 35               |
| 124 kDa in Glycerin<br>(66 % v/v in KPP)                 |                                           |                  |                  |                                       |                  |                  |
| meta-R <sub>a</sub> → meta-R <sub>c</sub> <sup>c)</sup>  | 670                                       | - 7              | 31               |                                       |                  |                  |
| meta-R <sub>a</sub> → meta-R <sub>ac</sub> <sup>c)</sup> | 48                                        | -51              | 17               | 0.5                                   | 9                | 53               |
|                                                          |                                           | -58              | 48               |                                       |                  |                  |
| 124 kDa, markiert mit<br>3 Resten FMA (in KPP)           | 370                                       | -50              | 61               | 10                                    | < 2              | 25               |

a) Raten bestimmt anhand der Berechnung reiner Intermediatspektren (vgl. 2.4.2.1.) und Vergleich mit Literaturdaten; die präexponentiellen Faktoren (dh. die Amplituden der einzelnen Prozesse) wurden mit Bezug auf die Extinktionsabnahme  $\Delta A_{667}(\infty) = 100\%$  normiert; negative Werte bezeichnen Absorptionsabnahme, positive Absorptionszunahme; <sup>b)</sup> 20 mM KPP, pH (298 K) = 7.7 mit 1% (v/v) Glycerin; <sup>c)</sup> Der Prozeß meta-R<sub>a</sub> → meta-R<sub>c</sub> konnte nicht mit einer einzigen Rate beschrieben werden und setzt sich deshalb wohl aus mindestens zwei Schritten zusammen (vgl. Text)



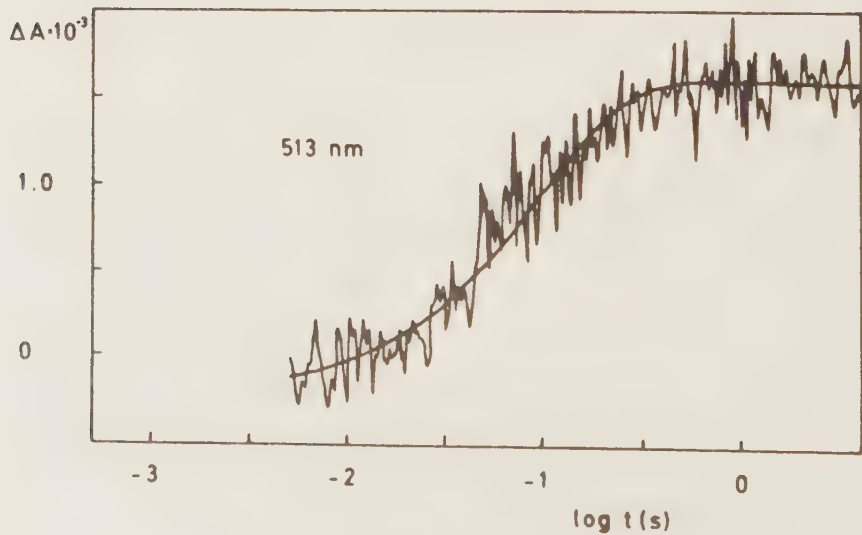
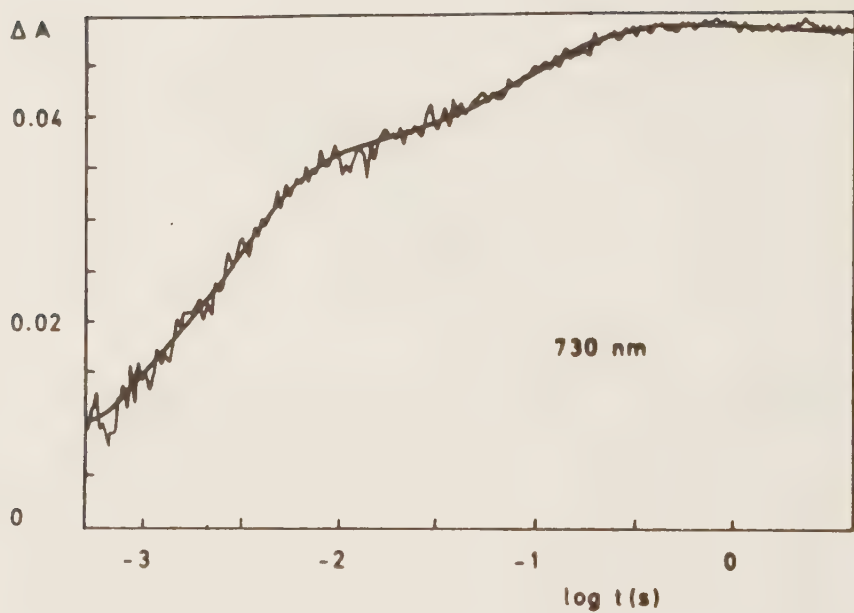
Hingegen wurde kein Absorptionsanstieg bei 695 nm beobachtet, was auf das Fehlen von lumi-R hindeutet. Dieses erste nachweisbare Intermediat zerfiel mit einer Halbwertszeit von etwa 5 ms (Abfall bei 720 nm, keine Änderung bei 660 nm) und es wurde (möglicherweise direkt)  $P_{b1}$  gebildet. Im vorliegenden Fall war der Mechanismus der Photokonversion somit offensichtlich ein anderer als bei unmodifiziertem Phytochrom.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wird deutlich, daß derartige Systeme zum Verständnis der Vorgänge im intakten Phytochrommolekül völlig ungeeignet sind, da die durch das hydrophobe Reagens ANS eingeführte Störung zu groß ist. Im folgenden sollen daher nur noch Species untersucht werden, die in der Lage sind,  $P_{fr}$  zu bilden.

Tab. 10 gibt einen Überblick über alle untersuchten Umgebungseinflüsse auf die Photokonversion. Zunächst wurde die Viskosität des Mediums durch Zugabe von *Glycerin* (66 %  $v/v$ ) bzw. des hochmolekularen Polydextrans *Ficoll* 40 000 (33 %  $m/v$ ) stark erhöht. Obwohl die  $P_{fr}$ -Absorption in Glycerin einen leichten Anstieg zeigte, waren die Absorptionsspektren allgemein denen unmodifizierten Phytochroms sehr ähnlich. Insbesondere Ficoll beeinflusste die Phototransformation nur schwach, der letzte Schritt wurde allerdings um einen Faktor von 2 verzögert. Da dieses relativ große Molekül nur Wechselwirkungen mit der Oberfläche des Phytochrom-Proteins eingehen kann, muß man aufgrund dieser Beobachtung annehmen, daß die für die Photokonversion verantwortliche Domäne relativ klein ( $< 40$  kDa) und somit für Ficoll nicht zugänglich ist.

Beim Übergang zu hochkonzentriertem Glycerin änderte sich diese Situation jedoch (Fig. 20). In diesem Fall war es nicht möglich, die Kinetik des meta-R<sub>a</sub>-Zerfalls durch lediglich zwei Prozesse, dh. durch ein weiteres Intermediat, zu beschreiben. Während nämlich die Absorption bei 667 nm zwi-

Fig. 20 : Absorptionsänderungen nach Laserblitz-Anregung (660 nm, 1 mJ) von 124 kDa  $P_R$  ( $A_{667} = 0.50$ ) bei 298 K in KPP mit 66 % ( $v/v$ ) Glycerin, gemessen bei 667 und 715 nm; logarithmische Zeit-skala; die aus den Raten in Tab. 10 berechneten Ausgleichskurven sind ebenfalls angegeben



schen 0,5 und 3 ms nach Laserblitz-Anregung nahezu konstant blieb, stieg die Absorption bei 715 nm bereits während dieses Zeitraums an. Nach 50 ms schließlich blieb  $A_{715}$  konstant,  $A_{667}$  jedoch nahm ab; ein Intermediat mit den spektralen Eigenschaften von  $\text{meta-R}_c$  wurde gebildet. Offensichtlich spaltete sich also die Bildung von  $\text{meta-R}_c$  aus  $\text{meta-R}_a$  in zwei aufeinanderfolgende Prozesse auf ( $\text{meta-R}_a \rightarrow \text{meta-R}_{ac} \rightarrow \text{meta-R}_c$ ), wobei lediglich der letzte Schritt in Glycerin stark verlangsamt wurde. Die  $P_{fr}$ -Bildung wurde so letztlich um einen Faktor von 20 verlangsamt.

### 3.2.2.3. Einfluß der Protein-Oberfläche

Die oben beschriebenen Viscositätseffekte lieferten Hinweise darauf, daß nennenswerte Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche erst im letzten Schritt der  $P_{fr}$ -Bildung auftreten. Um dies experimentell direkt nachweisen zu können, wären Absorptionsmessungen der Proteinkomponente nötig; allerdings sind die photoreversiblen Änderungen der Proteinabsorption im fernen Ultraviolett-Bereich sehr gering und nur schwierig zu verfolgen (TOBIN und BRIGGS, 1972).

Einen Ausweg aus dieser Problematik versprach auch hier die Markierung des Phytochrom-Proteins mit der chemischen Sonde FMA (Fig. 21). Dabei sollten nach Möglichkeit keine signifikanten Störungen des für unmodifiziertes Phytochrom gefundenen Intermediatschemas hervorgerufen werden, da ein in dieser Weise modifiziertes Apoprotein am besten den *in vivo* gegebenen Bedingungen entsprechen würde. Trotzdem sollte es möglich sein, anhand der markierten Aminosäuren die Orte der Wechselwirkung bzw. die Veränderungen der näheren Chromophorumgebung zu verfolgen, und zwar unabhängig von der Tetrapyrrolabsorption.

Fig. 21 : Phototransformation von 124 kDa  $P_r$  ( $A_{667} = 1.3$ ), markiert mit 3 Resten FMA bei 298 K in KPP, gemessen bei 730 und 513 nm nach Laserblitz-Anregung (660 nm, 1 mJ); die nach 2.4.2.2. berechneten Ausgleichskurven sind ebenfalls angegeben; Raten und Amplituden vgl. Tab. 10

Um auszuschließen, daß für die chemische Sonde beobachtete Absorptionsänderungen eigentlich auf entsprechenden Änderungen der Phytochromabsorption beruhen, wurde auch die Kinetik der  $P_{fr}$ -Bildung bei unmodifiziertem Phytochrom bei 513 nm (dem Maximum der Absorption von proteingebundenem FMA und dem isosbestischen Punkt der Phytochrom-Photokonversion) aufgenommen. Hierbei wurden zwischen 10 ms und 10 s keinerlei Änderungen festgestellt. Bei Betrachtung der Absorptionsänderungen bei 730 nm (Fig. 21 a) war es möglich, die Bildung einzelner Intermediate bzw. von  $P_{fr}$  mit definierten Zeitintervallen in Beziehung zu setzen. Hierbei ergab sich die Rate des  $meta-R_a$ -Zerfalls zu  $370 \text{ s}^{-1}$ , die des Zerfalls von  $meta-R_c$  zu  $12 \text{ s}^{-1}$ . Die gute Übereinstimmung dieser Werte mit den bei unmodifiziertem Phytochrom erhaltenen (3.2.2.1.) bestätigt die Annahme, daß die Photokonversion des Tetrapyrrolchromophors durch die eingeführte Sonde nicht beeinträchtigt wurde. Außerdem kann man anhand der Modifizierungsbedingungen (2.3.1.3.) annehmen, daß sich die eingeführten Fluorescein-Reste im wesentlichen auf der Proteinoberfläche befinden und deshalb auch Änderungen in diesem Bereich anzeigen. Fig. 21 b zeigt die Absorptionsänderungen von FMA auf der gleichen Zeitskala wie den Aufbau der  $P_{fr}$ -Absorption. Auffallend war hierbei, daß  $A_{513}$  erst nach über 20 ms anstieg, also zu einem Zeitpunkt, der der Reaktion  $meta-R_c + P_{fr}$  entspricht. Die korrespondierende kinetische Rate lag bei  $15 \text{ s}^{-1}$ , was gut mit dem für  $A_{730}$  erhaltenen Wert übereinstimmt (vgl.a. Tab. 10).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die Absorptionsänderungen des Fluorescein-Chromophors, die ja durch Polaritätsänderungen seiner Protein-Umgebung hervorgerufen wurden, gleichzeitig mit der Bildung von  $P_{fr}$  auftraten, die anhand der Tetrapyrrol-Absorption verfolgt werden konnte.

### 3.2.3. CIRCULAR-DICHROISMUS

Absorptionsspektren allein liefern nur unvollkommene Informationen über den Chromophor und seine Wechselwirkungen mit dem umgebenden Protein. Für ein besseres Verständnis dieser Prozesse ist der Circular-Dichroismus (CD) ein sehr nützliches Hilfsmittel, das zahlreiche zusätzliche Erkenntnisse ermöglicht (CANTOR und SCHIMMEL, 1980). Aus diesem Grund wurden sowohl der Circular-Dichroismus der betreffenden Intermediate als auch induzierter Circular-Dichroismus bei FMA-modifiziertem Phytochrom näher untersucht.

### 3.2.3.1. Circular-Dichroismus der Phytochrom-Intermediate

Als Grundlage für die Betrachtung modifizierten Phytochroms wurden zunächst CD-Differenzspektren (vgl.a. 2.4.3.) der Intermediate unmodifizierten Phytochroms aufgenommen, die genauere Informationen über die *Chromophon-Konformation* und über grundlegende chemische Vorgänge (insbesondere während des primären Photoprozesses) liefern sollten. Hiervon wurde eine methodisch unabhängige Bestätigung dafür erhofft, daß eine *Z-E-Isomerisierung* des Tetrapyrrol-Chromophors an der Bildung von lumi-R beteiligt ist.

Fig. 22 zeigt sowohl die CD- als auch die Absorptions-Differenzspektren bei tiefen Temperaturen, wobei auch die berechneten CD-Spektren der reinen Intermediate (vgl. 2.4.3.) angegeben wurden (zur allgemeinen Problematik dieser Berechnungen vgl. 3.2.1.1. und 3.2.2.1.). Hierbei stellt die tiefste gewählte Temperatur (170 K) die gerade noch tolerable Obergrenze für die Beobachtung von lumi-R dar ; aus technischen Gründen konnten jedoch keine tieferen Temperaturen erreicht werden. Unterhalb von 170 K bildete nämlich der Glycerinpuffer zwar Gläser ohne Sprünge und kristalline Einschlüsse, die aber zu Spannungspolarisationen führten, die die Messung von CD-Spektren völlig unmöglich machten. Andere Mischungsverhältnisse von KPP und Glycerin zeigten entweder dieselben Effekte (sogar bei noch höheren Temperaturen) oder bildeten eisartige Phasen mit Lichtstreuungs- und / oder Depolarisationseffekten.

Um Artefakte möglichst auszuschließen, wurde darüber hinaus die Photoreversibilität von lumi-R überprüft, wobei jeweils ein zum Ausgangssignal achsensymmetrisches CD-Signal (dh. mit gleicher Form aber umgekehrtem Vorzeichen) beobachtet wurde, dessen Amplitude als Maß für die Menge umgesetzten lumi-R's betrachtet werden konnte.

Allgemein waren sich die CD-Differenzspektren (Intermediat bzw.  $P_{fr}$  minus  $P_r$ ) sehr ähnlich, dh. im Gegensatz zum  $P_r$ -Spektrum zeigte das Absorptionsmaximum im roten Spektralbereich ein positives, das im blauen Spektralbereich ein negatives Vorzeichen. Eine Ausnahme von dieser grundsätzlichen Ähnlichkeit machte jedoch das Differenzspektrum von lumi-R, dessen Absorptionsmaxima ungewöhnlich intensiv waren, vor allem für das berechnete CD-Spektrum von reinem lumi-R. Sowohl die extremen Änderungen des CD-Spektrums als auch die Vorzeichenumkehr der beiden Banden bei der Bildung von lumi-R können dabei als deutliche Hinweise auf die bereits mehrfach erwähnte Beteiligung einer Z-E-Isomerisierung am Primärprozeß gedeutet werden.

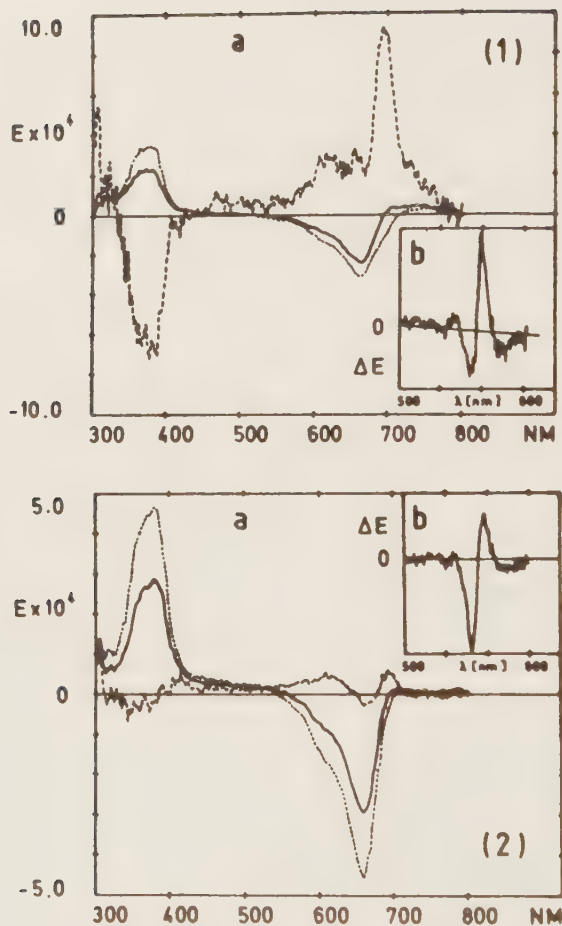
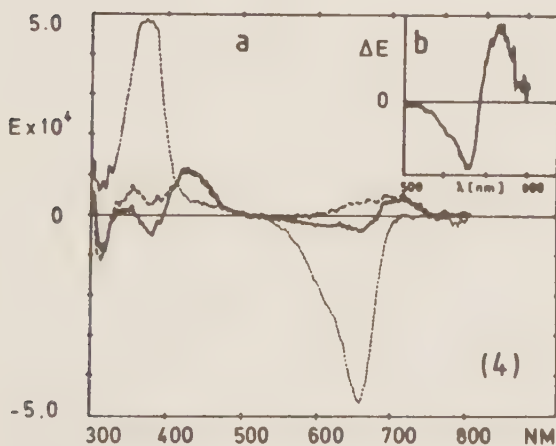
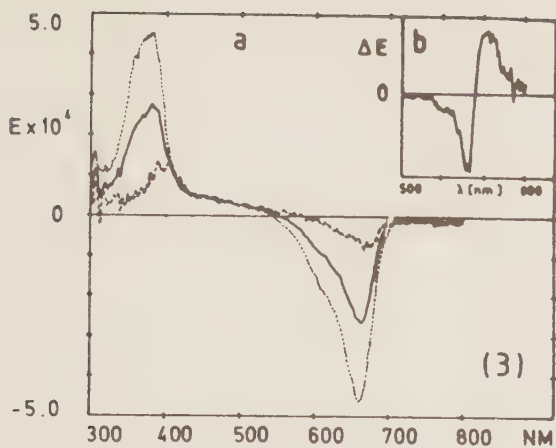


Fig. 22 : Photokonversion von  $P_r$  ( $A_{667} = 0.52$  bei 298 K) bei verschiedenen Temperaturen :

a) CD-Spektren von  $P_r$  (---), mit 660 nm belichtetem  $P_r$  (—, entspricht der Bildung der Intermediate bzw. von  $P_{fr}$ ) und reinen Intermediate (-.-, berechnet nach 2.4.3., zur allgemeinen Problematik vgl. Text)

b) Absorptionsdifferenzspektrum von hellrot belichtetem  $P_r$  minus unbelichtetem  $P_r$  als Grundlage zur Berechnung der Intermediate menge



1) Bildung von lumi-R bei 170 K (unter der Annahme eines lumi-R-Gehaltes von 11 % nach P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985)

2) Bildung von meta-R<sub>a</sub> (37 %) bei 200 K

3) Bildung von meta-R<sub>ac</sub> (50 %) bei 220 K

4) Bildung von P<sub>fr</sub> (86 %) bei 288 K

Die ungewöhnliche Intensität der berechneten CD-Banden von reinem lumi-R (deren Betrag etwa viermal so groß ist wie bei  $P_r$ ) könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, daß die rasche Dunkelreversion von mindestens einem Intermediat zu  $P_r$  statt zu  $P_{fr}$  (HEIHOFF et al., 1987) eine zu geringe Intermediatkonzentration vortäuscht, so daß bei der Berechnung von reinen Intermediatspektren zu hohe Amplituden erhalten werden. Eine exakte quantitative Behandlung dieses Problems ist allerdings außerordentlich schwierig, da die Dunkelreversion anhand von Blitzlicht-Experimenten postuliert worden war, im vorliegenden Fall jedoch *Photogleichgewichte bei tiefen Temperaturen* untersucht wurden. Analog zu den Betrachtungen in Abschnitt 3.2.2.1. kann man wiederum als Extremsituation annehmen, daß lumi-R mit einer Quantenausbeute von 50 %,  $P_{fr}$  jedoch mit 18 % Quantenausbeute gebildet wird, so daß die Bestimmung der lumi-R-Menge durch Auftauen (nach P.G. EILFELD und RÜDIGER, 1985) nur den etwa 0.38 fachen Betrag liefern würde. Dennoch würde das entsprechende CD-Spektrum nach wie vor bei 694 nm ein positives Signal (das dann in Fig. 22-1 etwa  $3 \times 10^{-4}$  Einheiten entsprechen würde) aufweisen und bei 380 nm ein schwaches negatives Signal ( $-1 \times 10^{-4}$  Einheiten). Dies ist mit der qualitativen Diskussion zur Bestätigung einer Z-E-Isomerisierung (s.o.) in jedem Falle noch vereinbar.

Für meta- $R_a$  resultiert ohne Dunkelreversion das in Fig. 22-2 angegebene Spektrum mit nur sehr geringem Circular-Dichroismus. Nimmt man eine größere Menge meta- $R_a$  im Photogleichgewicht an, würde dies zu einem  $P_r$ -ähnlichen Signal mit jedoch nur etwa halber Amplitude führen. Auch hier gilt allerdings, daß es zur Unterscheidung dieser prinzipiellen Möglichkeiten bisher keine weiteren (unabhängigen) Kriterien gibt. Aus diesem Grund soll an dieser Stelle auch keine weitergehende Diskussion für meta- $R_a$ , meta- $R_{ac}$  und  $P_{fr}$  erfolgen.

In Fig. 22-3 ist anstelle von meta- $R_c$  ein Intermediat meta- $R_{ac}$  angegeben. Dieses Intermediat entspricht vom Absorptions-Differenzspektrum her der Species, die 10 ms nach Laserblitzanregung bei 298 K gebildet wurde (vgl. 3.2.2.2., Fig. 20). Bei der Temperatur, bei der normalerweise meta- $R_c$  gebildet wird (250 K), schienen hingegen signifikante Mengen meta- $R_b$  im Gemisch mit meta- $R_c$  aufzutreten, die ein CD-Spektrum lieferten, das dem von BURKE et al. (1972) gefundenen ähnelte.

Trotz ihrer im Großen und Ganzen sehr ähnlichen Gestalt unterschieden sich die Differenzspektren von meta- $R_a$  und meta- $R_{ac}$  dennoch vom entsprechenden

$P_{fr}$ -Differenzspektrum, da letzteres ein deutliches Maximum bei 430 nm und eine Schulter bei etwa 725 nm aufwies; beide fehlten sowohl bei  $meta-R_a$  als auch bei  $meta-R_{ac}$ . Da diese Bande bei 430 nm auch im  $P_{fr}$ -Spektrum des degradierten 114 / 118 kDa Phytochroms fehlt (VIERSTRA et al., 1987), kann man annehmen, daß in allen diesen Fällen spezifische Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und einer Protein-Domäne im N-terminalen Bereich nicht mehr möglich sind. Nachdem Änderungen des Circular-Dichroismus aber sowohl durch Konformationsänderungen des Chromophors als auch durch die Protein-Umgebung selbst hervorgerufen werden können (BRASLAVSKY et al., 1980 a), sind Interpretationen dieser Phänomene auf molekularer Ebene zwangsläufig nicht eindeutig möglich.

### 3.2.3.2. Induzierter Circular-Dichroismus

Die erfolgreiche Anwendung von FMA als *chemische Sonde* (3.2.2.3.) ließ ähnlich eindrucksvolle Effekte auch für den Circular-Dichroismus erwarten. Wie Fig. 23 zeigt, wies das CD-Spektrum von FMA-modifiziertem Phytochrom ein negatives Signal bei 515 nm auf. Die Lage dieser Bande spricht gegen einen Circular-Dichroismus benachbart orientierter Dimere infolge von Austauschprozessen (CANTOR und SCHIMMEL, 1980), sondern eher für einen *induzierten Circular-Dichroismus* infolge einer chiralen Umgebung, wie sie Proteine gewöhnlich darstellen. Bei Dimeren würde man nämlich einen S-förmigen Kurvenverlauf des Spektrums finden, wobei der Wendepunkt der S-Kurve mit dem Absorptionsmaximum zusammenfallen würde, während Maximum und Minimum der CD-Kurve deutlich vom Absorptionsmaximum abweichen würden (CANTOR und SCHIMMEL, 1980). Im vorliegenden Fall hingegen zeigten Absorptionsspektrum und CD-Spektrum des Fluorescein-Chromophors die gleiche Bandenlage und Feinstruktur, wegen des Vorzeichens wurde ein negativer COTTON-Effekt (BURKE et al., 1972; HOPPE et al., 1982) gefunden.

Allerdings war der beobachtete Einfluß des Fluorescein-Chromophors bei  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Form nahezu gleich. Beim Übergang in 66% *Glycerin* wurde das CD-Signal jedoch intensiver und es traten ansatzweise Unterschiede zwischen beiden Phytochromformen auf, dh. die Bande bei 515 nm war bei modifiziertem  $P_{fr}$  etwas intensiver (nicht abgebildet).

Diese Beobachtungen lassen sich dadurch erklären, daß der Fluorescein-Chromophor (der über Quecksilber durch eine lineare sp-hybridisierte Bindung mit Cystein verknüpft ist) normalerweise freie Rotationen durchfüh-

ren kann, durch die sich spezifische Chiralitätseffekte statistisch gesehen herausmitteln. Nachdem zeitaufgelöste CD-Messungen bisher praktisch nicht möglich sind und bei tiefen Temperaturen die reinen Temperatureffekte (dh. die Rotationszeiten in Abhängigkeit von der Viskosität des Mediums) erheblich größer sein können, soll an dieser Stelle wegen der unerwarteten Komplexität des Systems auf eine weitergehende Behandlung verzichtet werden.

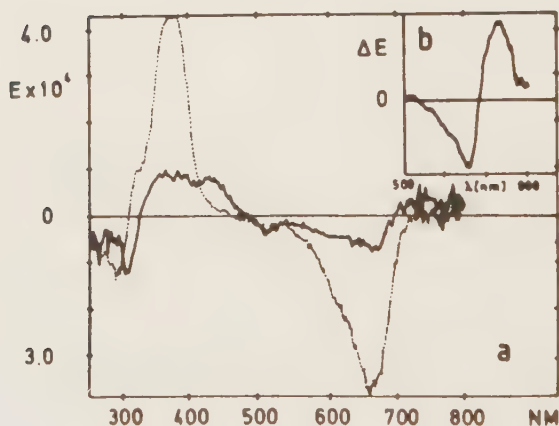


Fig. 23 : Photokonversion von chemisch modifiziertem 124 kDa Phytochrom (incubiert mit 3.5 mol FMA pro mol Phytochrom,  $A_{667}(P_R) = 1.0$ , dh.  $8 \mu M$  pro Monomer) bei 302 K; im Bereich der FMA-Absorption ( $\lambda_{max} = 513 \text{ nm}$ ) findet man eine negative Bande; unmodifiziertes Phytochrom nicht abgebildet (vgl. hierzu VIERSTRA et al., 1987) :

a) CD-Spektren von  $P_R$  nach sättigender Belichtung mit 730 nm (.....) und  $P_{FR}$  nach sättigender Belichtung mit 660 nm (—)  
 b) Absorptionsdifferenzspektrum  $P_{FR}$  minus  $P_R$

### 3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE ASPEKTE

Bisher wurden ausschließlich die Eigenschaften von Phytochrom als isoliertes Photorezeptorpigment behandelt. Allerdings ist Phytochrom allein wohl nicht fähig, *physiologische Prozesse* zu steuern, sondern benötigt aller Wahrscheinlichkeit nach Cofaktoren und / oder andere Proteine, um funktionsfähige Einheiten zu bilden. Im letzten Teil dieser Arbeit sollen daher einige Aspekte dieser Signalkette untersucht werden.

Bei der chemischen Modifizierung waren unterschiedliche Domänen gefunden worden. In diesem Zusammenhang stellt sich nun die Frage, inwieweit diese Domänen für die physiologische Wirkung von Bedeutung sind. Dies setzt ein funktionsfähiges *in vitro*-System zur Simulation der Vorgänge in der lebenden Pflanze voraus. Bislang ist allerdings nur ein einziges derartiges System beschrieben worden, nämlich die *in vitro*-Transriptionskontrolle an isolierten Roggen-Zellkernen (ERNST und OESTERHELT, 1984 ; MÖSINGER et al., 1987).

#### 3.3.1. NACHWEIS VON PHYTOCHROM AN ISOLIERTEN ZELLKERNEN

Um die Wechselwirkungen zwischen Phytochrom und *Zellkernen* besser zu verstehen, war es zunächst notwendig, die äußeren Gegebenheiten näher kennenzulernen. Aus diesem Grund wurde versucht, die Menge Phytochrom an isolierten Zellkernen zu bestimmen.

Um nun das erprobte Roggensystem auf Hafer übertragen zu können, mußten als erstes Zellkerne aus etiolierten Haferkeimlingen isoliert und gereinigt werden. Insbesondere wegen der kurzen Isolierungszeit schien die Methode von ERNST und OESTERHELT (1984) hierfür geeignet zu sein, allerdings mußten einige wesentliche Parameter verändert werden (vgl. 2.5.1.), um zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten. Insbesondere erwies sich der pH-Wert der verwendeten Puffer als ausgesprochen kritisch. Nach der abgewandelten Methode gelang es schließlich,  $\geq 90\%$  reine Zellkernfraktionen zu erhalten, ein Beispiel zeigt Fig. 24 a.

Ausgehend von der Annahme, daß Phytochrom an Zellkerne assoziiert und somit durch Abzentrifugieren der Kerne fällbar ist, wurden analog dem von SCHWARZ und SCHNEIDER (1986) beschriebenen ELISA-Verfahren polyclonale Antikörper an die Proteinkomponente gebunden und Phytochrom mit Hilfe

eines enzymatisch oxidierten Farbstoffes kolorimetrisch nachgewiesen (nähere Einzelheiten s. 2.5.2.). Im Gegensatz zur Situation in der lebenden Pflanze ist die Kernmembran nach Präparation in Gegenwart von *Triton X-100* ziemlich porös und somit für Proteine leicht durchlässig (ERNST und OESTERHELT, 1984); daher erschien die gewählte Vorgehensweise als recht erfolgversprechend. Die Nachweisgrenze pro Ansatz lag dabei im vorliegenden Fall bei etwa 1 ng.

Tab. 11 faßt die erhaltenen Ergebnisse für unterschiedliche Präparationsmethoden zusammen. Hierbei ergaben sich sowohl in Hinblick auf das Alter der Keimlinge als auch auf die Art der Vorbelichtung keine signifikanten Unterschiede, die Daten streuten lediglich innerhalb statistischer Grenzen. In allen Fällen betrug die Phytochrommenge etwa 0.01 pg pro Zellkern

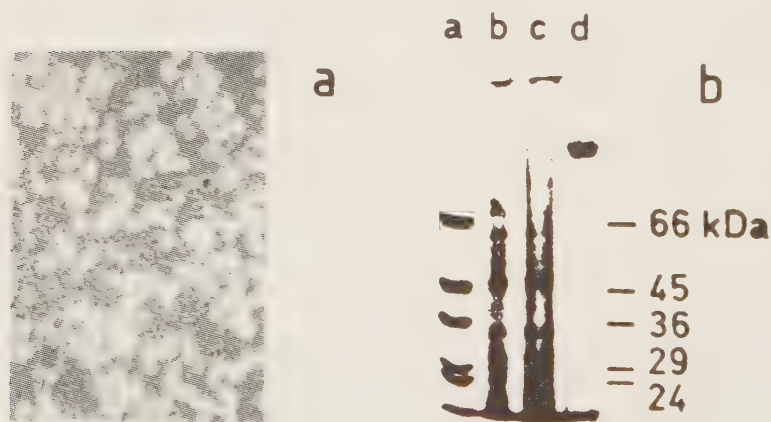


Fig. 24 : Zellkerne, isoliert aus 70 Std. alten etiolierten Haferkeimlingen, Reinigung s. 2.5.1. :  
a) mikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 125 fach  
b) SDS-Gelelektrophorese (10 % Polyacrylamid, Coomassie-Färbung): Eichproteine (Spur a), Zellkerne aus unbelichteten Keimlingen (Spur b), Zellkerne, unmittelbar nach sättigender Belichtung mit 660 nm isoliert (Spur c) und isoliertes 124 kDa Hafer-Phytochrom (Spur d)

in Übereinstimmung mit ähnlichen Untersuchungen an isolierten Erbsenzellkernen (NAGATANI, A., G.I. JENKINS und M. FURUYA, unveröffentlicht), die methodisch unabhängig über Western-Blot-Verfahren durchgeführt worden waren. Damit lag der Phytochromgehalt etwa doppelt so hoch wie im umgebenden Cytoplasma (VIERSTRA und QUAIL, 1983 a). Außerdem wurde im Gegensatz zu Ergebnissen an isolierten Mitochondrien (SERLIN und ROUX, 1986) beob-

TAB. 11 : PHYTOCHROMGEHALT AN HAFER-ZELLKERNEN <sup>a)</sup>

| Alter der Keimlinge in Std. | Belichtung <sup>b)</sup> | Zeitintervall Belichtung bis Ernte | Phytochrommenge in Moleküle pro Zellkern <sup>c)</sup> |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 70 - 75                     | -                        | -                                  | 9 700                                                  |
|                             | HR                       | 0                                  | 68 000                                                 |
|                             | HR                       | 30 Min.                            | 68 000                                                 |
|                             | HR                       | 4.5 Std.                           | 14 600                                                 |
| 90 - 95                     | -                        | -                                  | 14 600                                                 |
|                             | HR                       | 0                                  | 68 000                                                 |
|                             | HR                       | 5 Min.                             | 48 600                                                 |
|                             | HR                       | 10 Min.                            | 19 400                                                 |
|                             | HR                       | 20 Min.                            | 68 000                                                 |
|                             | HR                       | 2 Std.                             | 9 700                                                  |
|                             | HR                       | 27 Std.                            | 68 000                                                 |
| 115                         | HR                       | 0                                  | 9 700                                                  |
|                             | HR                       | 5 Min.                             | 9 700                                                  |
| 140                         | -                        | -                                  | 19 400                                                 |
|                             | HR                       | 0                                  | 68 000                                                 |
|                             | HR                       | 30 Min.                            | 9 700                                                  |
|                             | HR / DR                  | 30 Min.                            | 9 700                                                  |

<sup>a)</sup> Ansatz 500 000 Kerne pro Messung; 1 ng Phytochrom pro Ansatz entspricht somit ca 9 700 Phytochrommolekülen pro Zellkern; <sup>b)</sup> HR (Hellrot) = 660 nm, DR (Dunkelrot) = 730 nm; <sup>c)</sup> gemessen nach 15 Min., minus Kontrollwert aus einem identischen Ansatz, allerdings ohne anti-Phytochrom-Antikörper (vgl. 2.5.2.)

achtet, daß der Phytochromgehalt nach Belichtung nicht statistisch signifikant anstieg, daß also in diesem Fall wohl kein wesentlicher Proteintransport vom Cytoplasma in den Kern stattgefunden hatte. Phytochromeffekte an Zellkernen *in vivo* (CHEN und ROUX, 1986) sind somit wohl auf endogen bereits vorhandenes Phytochrom zurückzuführen.

### 3.3.2. BINDUNG VON MODIFIZIERTEM PHYTOCHROM AN ZELLKERNE

Trotz der oben beschriebenen Beobachtungen wurde versucht, *exogenes* Phytochrom an isolierte Hafer-Zellkerne zu assoziieren. Um dieses von eventuell vorhandenem *endogenen* Phytochrom unterscheiden zu können, wurde hierzu mit 1,8-IAEDANS fluoreszenzmarkiertes Phytochrom eingesetzt, das dem Extraktionspuffer in physiologischer Konzentration zugegeben worden war (2.5.3.). Die so behandelten und ansonsten wie beschrieben gereinigten Zellkerne wurden in SDS-Probenpuffer gelöst. Auf SDS-Polyacrylamid-Gelen von entsprechenden Zellkernextrakten (Fig. 24 b) konnte jedoch kein fluoreszierendes Phytochrom gefunden werden (Nachweisgrenze 100 ng pro Gelspur, Ansatz 1 Million Kerne), was bedeutet, daß weniger als 0.1 pg pro Zellkern tatsächlich gebunden werden konnte, was mit den unter 3.3.1. beschriebenen Ergebnissen zu vereinbaren ist.

### 3.3.3. GENREGULATION BEI ISOLIERTEN ZELLKERNEN

ERNST und OESTERHELT (1984) hatten beobachtet, daß isoliertes Roggenphytochrom bei isolierten Roggen-Zellkernen eine Erhöhung des Einbaus von  $^{32}\text{P}$ -UTP in *de novo* synthetisierte mRNA bewirkte, was einer *Transcriptionssteigerung* entsprach.  $\text{P}_{\text{fr}}$  bewirkte dabei eine hochsignifikante Steigerung, während  $\text{P}_{\text{r}}$  nur unwesentliche Effekte hervorrief.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nun das analoge Experiment mit isoliertem Hafer-Phytochrom versucht. Die Aktivität der verwendeten Roggen-Zellkerne wurde dabei durch einen Parallelansatz mit 124 kDa Roggenphytochrom kontrolliert. Analoge Versuche mit Hafer-Zellkernen erwiesen sich infolge ihrer erheblich geringeren Stabilität als nicht erfolgversprechend.

Tab. 12 stellt die wesentlichsten erhaltenen Ergebnisse dar. Grundsätzlich bewirkte 124 kDa Haferphytochrom immer eine Steigerung des  $^{32}\text{P}$ -Einbaus, allerdings war der Effekt etwas geringer und der Unterschied beider Phytochromformen etwas weniger ausgeprägt als beim entsprechenden Roggen-System. Somit scheint die Kreuzreaktion etwas weniger spezifisch zu sein, was beim engen Verwandtschaftsgrad von Hafer und Roggen doch etwas überrascht.

TAB. 12 : EINBAU VON  $^{32}\text{UTP}$  IN NEUSYNTHETISIERTE  $\text{mRNA}$  <sup>a)</sup>  
AN ISOLIERTEN ROGGEN-ZELLKERNEN <sup>b)</sup> BEI INCUBATION MIT VERSCHIEDENEN PHYTOCHROMSPECIES

| Kontrolle :<br>unmodifiziertes <sup>c)</sup><br>Phytochrom |                 | FMA-modifiziertes<br>Phytochrom |                 | FMA-Reste<br>pro Molekül<br>Phytochrom | modifiziertes :<br>unmodifiziertes<br>Phytochrom |                 |
|------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------|
| $\text{P}_r$                                               | $\text{P}_{fr}$ | $\text{P}_r$                    | $\text{P}_{fr}$ |                                        | $\text{P}_r$                                     | $\text{P}_{fr}$ |
| 126                                                        | 162             | 138                             | 169             | 1.5                                    | ca 1.10                                          | 1.04            |
| 168                                                        | 174             | 177                             | 160             | 4                                      | 1.05                                             | 0.92            |
| 138                                                        | 131             | 133                             | 134             | 10                                     | 0.96                                             | 1.02            |
| 142                                                        | 126             | 130                             | 134             | 12                                     | 0.92                                             | 1.06            |

<sup>a)</sup> angegeben in % des Kontrollwertes (statt Phytochrom entsprechende Menge Puffer, vgl. 2.5.4.); Fehlergrenze  $\pm 10\%$ ; <sup>b)</sup> zwischen belichteten und unbelichteten Zellkernen wurden keinerlei Unterschiede gefunden;

<sup>c)</sup> 124 kDa Phytochrom aus etiolierten Haferkeimlingen; es wurden keinerlei Unterschiede zwischen Proben verschiedener Reinheit (SAR 0.8–0.96) gefunden; Reinigung erfolgte jeweils durch Gelchromatographie; zwei hiervon unabhängige Kontrollen ergaben die Werte 173 bzw. 145 für  $\text{P}_r$  sowie 199 bzw. 173 für  $\text{P}_{fr}$

Ähnliche Ergebnisse ergab die Verwendung von *chemisch modifiziertem* Phytochrom. Hierbei wurde durch Incubation mit FMA unter verschiedenen Bedingungen (2.3.1.3.) die Photoreversibilität schrittweise reduziert. Im Extremfall wurden sogar völlig gebleichte, photochemisch inaktive Species (vgl. Fig. 7) eingesetzt. Zwar wurde unter den erforderlichen Incubationsbedingungen (*Dithioerythritol* im Transcriptionspuffer) FMA wieder vom Phytochromprotein abgespalten, jedoch blieb die Denaturierung irreversibel (vgl. Fig. 7). Dennoch wurde mit allen diesen Phytochromspecies die gleiche Steigerung des  $^{32}\text{P}$ -UTP-Einbaus erzielt, während andere Proteine (z.B. *Rinder-Serumalbumin*) oder stark verunreinigte Phytochrom-Präparationen mit  $\text{SAR} \leq 0.25$  die Transcriptionsrate eher leicht senkten.

Somit liegt der Schluß nahe, daß die nur wenig lichtabhängige Steigerung der Transcriptionsrate durch isoliertes Hafer-Phytochrom von einer Domäne gesteuert wird, die *nicht* zu photoreversiblen Konformationsänderungen in der Lage ist. Hierbei könnte es sich um die C-terminale Hälfte des Apoproteins handeln.

## 4. DISKUSSION

### 4.1. CHEMISCHE REAKTIVITÄT

Die chemische Modifizierung ist allgemein eine weit verbreitete Methode zur *Lokalisierung* von aktiven Aminosäuren bei Proteinen und insbesondere bei Enzymen (MEANS und FEENY, 1971; GLAZER et al., 1982). Hierbei kann oft durch gezielte chemische Modifizierung einer einzigen Aminosäure die enzymatische Aktivität vollkommen ausgeschaltet werden.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, besitzt auch 124 kDa Haferphytochrom 2-3 hochreaktive *Cystein*-Reste, die in ihrer Reaktivität mit freien Mercaptanen vergleichbar sind. Dabei sind die betreffenden SH-Gruppen wohl noch reaktiver als ein exponiertes Cystein des *Halorhodopsins*, das entscheidend an der Photochemie dieses Sensorpigments des Archebakteriums *Halobacterium halobium* beteiligt ist (SCHEGK et al., 1986). Aus diesem Grund liegt es nahe, den hochreaktiven Cysteinen des Phytochroms ebenfalls wichtige Funktionen zuzuschreiben. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung bestätigt, daß in der physiologisch aktiven  $P_{fr}$ -Form ein zusätzlicher Cystein-Rest (verglichen mit  $P_r$ ) exponiert ist. Versuche zur Lokalisierung dieser reaktiven SH-Gruppen ergaben, daß die beiden sowohl in der  $P_r$ - als auch in der  $P_{fr}$ -Form reagierenden Reste zur C-terminalen Hälfte des Apoproteins gehören. Diese Domäne war von JONES und QUAIL (1986) als diejenige identifiziert worden, an der die *in vitro* oft beobachtete Dimerisierung von Phytochrom erfolgt. Ebenso erwies sich, daß die C-terminale Hälfte leicht proteolytisch fragmentiert werden kann (QUAIL et al., 1986), dh. daß dieser Proteinteil wohl eine vergleichsweise wenig stabilisierte Struktur besitzt. Auch dies läßt sich gut mit der hier beobachteten hohen Reaktivität vereinbaren.

Die *photochemisch aktivierbare* SH-Gruppe hingegen wurde in Chromophornähe auf der N-terminalen Hälfte des Apoproteins lokalisiert. In diesem Bereich waren durch unabhängige Methoden ebenfalls Konformationsänderungen festgestellt worden (unterschiedliche Affinität zu Antikörpern: THOMAS et al., 1984; CORDONNIER et al., 1985; THOMAS und PENN, 1986). Hieraus wird deutlich, daß die Konformationsänderungen beim Übergang  $P_r \rightarrow P_{fr}$ , die für die physiologische Aktivität wohl entscheidend sind, sich auch in Form un-

terschiedlicher chemischer Reaktivität ausdrücken. Die Frage, ob diese unterschiedliche chemische Reaktivität jedoch auch für die primäre molekulare Wirkung von Phytochrom in der lebenden Pflanze verantwortlich ist, kann im Moment noch nicht schlüssig beantwortet werden, da der molekulare Mechanismus der Phytochromwirkung in entscheidenden Punkten noch völlig unklar ist.

Neben diesen drei SH-Gruppen finden sich noch eine Vielzahl weiterer Cysteine, die allerdings chemisch weit weniger reaktiv sind. Die chemische Modifizierung dieser Reste führte zum schrittweisen Ausbleichen der Chromophorabsorption und zu mehr oder weniger stark eingeschränkter Photochromie. Dies legt den Schluß nahe, daß die betreffenden Cysteine an Stellen lokalisiert sind, die für die Stabilität der dreidimensionalen Struktur und für den Mechanismus der Photokonversion von Bedeutung sind.

Für die Hypothese, daß *Lysin*-Reste ähnliche Funktionen wahrnehmen könnten (BURTNICK, 1984), sprechen weniger Befunde. Durch Absenkung des pH-Wertes kann nämlich die Reaktivität von Lysin im Gegensatz zu der von Cystein deutlich reduziert werden, ohne daß jedoch die beobachteten Bleichungseffekte wesentlich beeinflußt würden. Die Zahl reaktiver nucleophiler Aminosäuren (hauptsächlich Cystein und Lysin) nähert sich dabei dem Wert, der für Cystein gefunden worden war.

Überraschenderweise erwies sich  $P_r$  als grundsätzlich empfindlicher gegenüber Bleichung als  $P_{fr}$ , was darauf hindeutet, daß die Proteinoberfläche in der  $P_r$ -Form weniger stabilisiert und somit leichter angreifbar ist. Übereinstimmend ergaben außerdem sowohl kovalente Modifizierung als auch nicht-kovalente Modifizierung (dh. die Intercalation hydrophober Reste), daß das Phytochrommolekül in hohem Maße durch intramolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten wird.

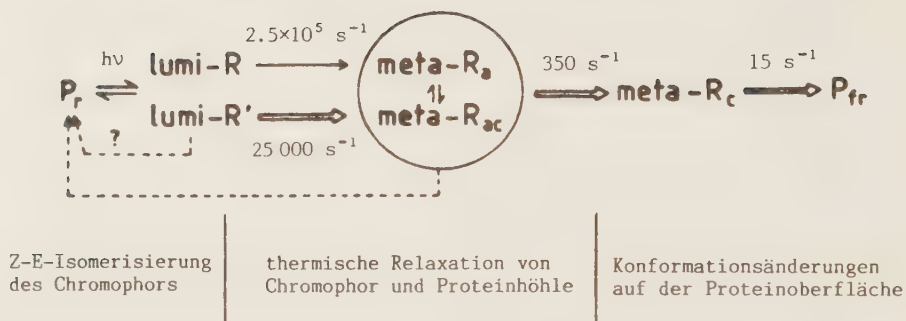
## 4.2. PHOTOCHEMIE UND PHOTOBIOPHYSIK

Bei allen Photorezeptorpigmenten stellt sich grundsätzlich die Frage nach dem *Mechanismus des Primärprozesses*. Aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse kann man im Falle des Phytochroms mit großer Wahrscheinlichkeit anstatt des von SONG et al. (1974) postulierten Protonen-Transfers eine Z-E- (*cis-trans*-) Isomerisierung annehmen.

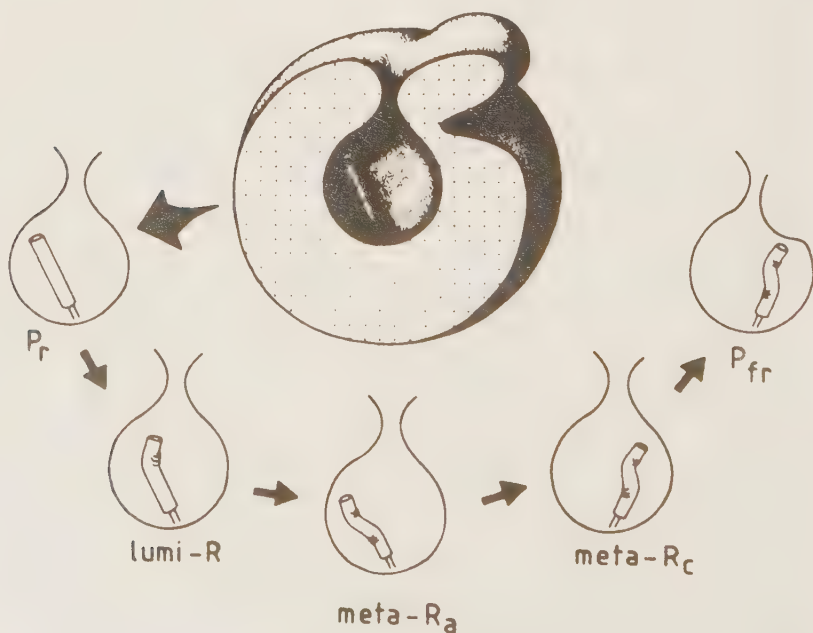
So zeigt zum einen die Bildung der ersten nachweisbaren Zwischenstufe lumi-R keinen Isotopeneffekt beim Austausch von  $^1\text{H}$  gegen  $^2\text{D}$ , zum anderen läuft der Primärprozeß auch bei umfangreicher Modifizierung (von Cystein und Lysin) noch nahezu ungestört ab, obwohl das eigentliche Endprodukt der Photokonversion  $P_{fr}$  nicht mehr gebildet werden kann. Wie bereits frühere Untersuchungen von P.G. EILFELD und RÜDIGER (1984) deutet dies darauf hin, daß ein Teil der an der Photokonversion beteiligten Prozesse in einem geschützten Bereich des Proteins (im Protein-Innern?) abläuft. Die vorliegende Arbeit lieferte Hinweise dafür, daß es sich hierbei vor allem um die Bildung von lumi-R und die darauf folgende thermische Relaxation zu  $\text{meta-R}_a$  handeln könnte.

Hierbei fungiert  $\text{meta-R}_a$  als eine Art *Schaltstelle* für die folgenden Reaktionen, dh. je nach Art und Umfang der chemischen Modifizierung fällt an dieser Stelle die Entscheidung, ob intaktes  $P_{fr}$  oder gebleichte Formen ( $P_{bl}$ ) gebildet werden. Diese Vermutung wird auch durch die Untersuchung der Dynamik des  $\text{meta-R}_a$ -Zerfalls mit Hilfe schneller kinetischer Messungen unterstützt. Man kann sogar weiter annehmen, daß der Zerfall von  $\text{meta-R}_a$  mit der beobachteten Drehung des Chromophors (SUNDQVIST und BJÖRN, 1983; KRAML et al., 1984; KADOTA et al., 1986) korreliert ist. Dies folgt einerseits aus den übereinstimmenden Zeitbereichen und andererseits aus der unterschiedlichen Beeinflussung der Prozesse  $P_r \rightarrow \text{lumi-R} \rightarrow \text{meta-R}_a$  und  $\text{meta-R}_a \rightarrow \text{meta-R}_c \rightarrow P_{fr}$  durch chemische Modifizierung oder Proteolyse (REIFF et al., 1985). Das durch den Zerfall von  $\text{meta-R}_c$  bei 124 kDa Phytochrom gebildete  $\text{meta-R}_c$  besitzt zwar schon wesentliche (spektrale) Eigenschaften des  $P_{fr}$ , andererseits erfolgen jedoch die für die physiologische Wirkung wohl entscheidenden Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche erst im letzten Schritt der Photokonversion, dh. bei der  $P_{fr}$ -Bildung. Dies konnte durch Markierung des Proteins mit einer *chemischen Sonde* unabhängig von der Tetrapyrrol-Absorption gezeigt werden.

a



b



Alle bisher über den Mechanismus der Photokonversion gewonnenen Erkenntnisse sind in Fig. 25 zusammengefaßt. Fig. 25a stellt dabei ein *kinetisches Modell* vor, das auch die neuere Literatur miteinbezieht (RUZSICKSKA et al., 1985; HEIHOFF et al., 1987; ARAMENDIA et al., 1987). Demnach ist die photochemische Bildung von lumi-R aus  $P_r$  mit der Z-E-Isomerisierung des Chromophors verbunden. In parallelen Wegen (von denen jedoch einer deutlich dominiert, dh. ca 80% des Umsatzes bewirkt) erfolgt anschließend der Zerfall zu meta- $R_a$ . Dieses Intermediat scheint aufgrund der in Glycerin beobachteten Effekte sowie in Übereinstimmung mit Photoreversions-Experimenten von SCHEUERLEIN et al. (1986) ebenso wie lumi-R nicht homogen zu sein, sondern vielmehr recht komplexe Relaxationsprozesse einzugehen. Aus der Bestimmung der Quantenausbeuten modifizierter Phytochrome kann man weiterhin schließen, daß spätestens an dieser Stelle die postulierte Dunkelreversion zu  $P_r$  erfolgt (HEIHOFF et al., 1987). Somit fungiert meta- $R_a$  als Ausgangspunkt für die verschiedenartigsten Prozesse und ermöglicht, aus zunächst parallelen Wegen auf einem nunmehr sequentiellen Weg über meta- $R_c$  schließlich  $P_{fr}$  zu bilden. Dies würde auch den scheinbaren Widerspruch aufklären, daß aus heterogenen Vorstufen (lumi-R bzw. lumi-R', entspricht  $I_{700}^1$  und  $I_{700}^2$ ) dennoch ein einheitliches Endprodukt ( $P_{fr}$ ) gebildet werden kann.

Fig. 25 : Schematische Darstellung der Photokonversion von 124 kDa  $P_r$  :  
a) Schritte der  $P_r$ -Konversion: photochemischer Primärprozeß ( $\rightleftharpoons$ ), thermische Relaxationen ( $\rightarrow$  und  $\Rightarrow$ ) sowie Dunkelreversion zu  $P_r$  ( $\dashrightarrow$ ); Raten aus RUZSICKSKA et al., 1985, ARAMENDIA et al., 1987 und aus der vorliegenden Arbeit  
b) Änderungen der Chromophorkonformation ( $P_r \rightarrow$  lumi-R  $\rightarrow$  meta- $R_a$ ), Chromophorrotation (meta- $R_a \rightarrow$  meta- $R_c$ ) und lokale Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche (meta- $R_c \rightarrow P_{fr}$ ); die Darstellung dient lediglich zur Veranschaulichung und soll keine konkrete Raumstruktur wiedergeben. Die median angeschnittene Kugel stellt das Apoprotein mit exponiertem N-terminalen Bereich (rechts oben) dar, der Zylinder den Chromophor, der sich geschützt in einer Proteinhöhle (schattiert) befindet

Die Hintereinander-Anordnung  $\text{meta-R}_c \rightarrow \text{P}_{fr}$  begründet sich dabei sowohl aus den entsprechenden kinetischen Analysen als auch aus der Zuordnung von *Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche* zu diesem letzten Schritt. Um eine Vorstellung von den auftretenden molekularen Prozessen zu ermöglichen, sind alle Schritte in Fig. 25 b noch einmal bildlich dargestellt. Diese Abbildung soll allerdings nur der Veranschaulichung dienen und sollte deshalb lediglich als modellhafte Arbeitsgrundlage betrachtet werden. Sie vereinigt in einfacher Weise zahlreiche experimentelle Befunde: Der Primärprozeß  $\text{P}_r \rightarrow \text{lumi-R}$  läuft dabei in einer von außen nur schlecht zugänglichen Proteinhöhle ab. Bei der angedeuteten Chromophor-Rotation (die - dreidimensional betrachtet - relativ geringfügig sein kann) im Schritt  $\text{meta-R}_a \rightarrow \text{meta-R}_c$  kommt die Wechselwirkung mit unterschiedlichen Proteinbereichen zum Ausdruck (s.o.), andererseits ist die Dunkelreversion zu  $\text{P}_r$  an dieser Stelle noch relativ einfach möglich. Nach der Bildung von  $\text{meta-R}_c$  jedoch ändert sich (induziert durch die Veränderungen der Chromophor-Geometrie) die Konformation der Proteinumgebung. Dies bewirkt nur noch geringfügige Beeinflussungen der Chromophorabsorption und resultiert letztlich in Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche, die die Erkennung von  $\text{P}_{fr}$  durch einen (derzeit noch hypothetischen) Rezeptor ermöglichen würden.

### 4.3. MODELLVORSTELLUNGEN ZUR PHYTOCHROMWIRKUNG

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, daß  $P_r$  und  $P_{fr}$  sich in Bezug auf die Konformation auf der Proteinoberfläche unterscheiden, wobei die betreffenden sterischen Änderungen den langsamsten Schritt darstellen und außerdem vom umgebenden Medium beeinflusst werden können. Dies erklärt auch die sehr unterschiedlichen Raten der  $P_{fr}$ -Bildung *in vivo* abhängig von Gewebe und Wassergehalt (SCHEUERLEIN et al., 1986). Ebenso stellte sich heraus, daß in der  $P_{fr}$ -Form (wie bereits lange vermutet, z.B. QUAIL et al., 1983) tatsächlich eine hydrophobe Region exponiert wird.

Allerdings ist diese Region wohl nicht die einzige für die *physiologische* Phytochromwirkung wichtige Komponente. Sowohl chemische Reaktivität als auch die Kontrolle der Transcription *in vitro* bestärken die Annahme, daß *mindestens zwei* funktionell bedeutsame Domänen vorhanden sind, von denen eine in beiden Phytochromformen exponiert ist.

Die *in vitro* Transcriptionsrate bei isolierten Roggenkernen wird dabei sowohl durch isoliertes Roggen- als auch durch Haferphytochrom gesteigert, allerdings zeigt letzteres nur noch geringe Unterschiede zwischen  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Wirkung. Sogar chemisch vollkommen denaturiertes, nicht mehr photoreversibles Phytochrom bewirkt die gleichen Effekte. Das bedeutet, daß die beobachtete Steigerung wohl auf einen funktionellen Bereich zurückzuführen ist, der nicht photoreversibel exponiert werden muß, also auf die C-terminale Hälfte. Inwieweit hier allgemein konservierte Proteinbereiche vorliegen, kann jedoch derzeit noch nicht allgemeingültig beantwortet werden.

Die *photoreversible* Kontrolle von physiologischen Primärprozessen erfolgt hingegen über die N-terminale Hälfte. Eine derartige multifunktionelle Wirkung von Phytochrom ließe sich auch mit seiner ungewöhnlich hohen Molekularmasse vereinbaren. Dies würde der Pflanze die komplexe Differenzierung physiologischer Prozesse ermöglichen, zumal Phytochrom darüber hinaus auch genetisch heterogen zu sein scheint (HERSHEY et al., 1985).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

- (1) Aus etiolierten Haferkeimlingen wurde 124 kDa *Phytochrom* isoliert, wobei es erstmalig gelang, dieses Chromopeptid ausschließlich mit Hilfe von Hydroxylapaptit-Chromatographie, Ammonsulfatfällung und Gelchromatographie um einen Faktor von 250 (jeweils bezogen auf den Gesamtproteingehalt) anzureichern, wobei die elektrophoretische Reinheit etwa 95 %, der spektrale Reinheitsindex (SAR) 0.96 betrug. Das so erhaltene Material erwies sich als für chemische Modifizierungen uneingeschränkt geeignet.
- (2) Die allgemeine Stabilität und *chemische Reaktivität* des Proteins wurde mit Hilfe verschiedener Reagentien untersucht, wobei vor allem Denaturierungsmittel, Lysin / Cystein-selektive und Cystein-spezifische Substanzen eingesetzt wurden.
- (3) Als Lysin / Cystein-selektives Modifizierungsreagens wurde *Fluor-2,4-dinitrobenzol* (FDNB, Sanger's Reagens) mit *Phytochrom* umgesetzt, wobei bis zu 30 Aminosäurereste pro *Phytochrom*molekül reagierten. Bei Absenkung des pH-Wertes wurde die Reaktivität erniedrigt, was auf die Beteiligung von Lysin-Resten hindeutet. Je nach Anzahl der umgesetzten Reste konnten spektral verschiedene photoreversible Systeme erhalten werden, die alle Übergänge von der Photokonversion  $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$  bis zum System  $P_{655} \rightleftharpoons P_{bl}$  zeigten.
- (4) Spezifisch SH-Gruppen modifizierende Reagentien (insbesondere *quecksilberorganische Verbindungen*) konnten an *Phytochrom* gebunden werden und bewirkten ebenfalls Veränderungen der Photoreversibilität. Hierbei erwies sich die Bleichung der Chromophorabsorption und die Reduktion der Photochromie als sterischer Effekt, bewirkt durch die Raumerfüllung des jeweiligen eingeführten Restes. Maximal waren etwa 15 Cysteine zugänglich. Einige dieser Reste waren hochreaktiv und sind deshalb wohl exponiert. Für die physiologisch aktive  $P_{fr}$ -Form wurden dabei 3, für die  $P_r$ -Form 2 reaktive Cysteine gefunden.

- (5) *Hochreaktive Cysteinreste* konnten durch tryptische Kartierung bestimmten Domänen des Phytochrom-Apoproteins zugeordnet werden. Zwei dieser Reste reagierten unspezifisch und wurden auf der Chromophorfreen C-terminalen Hälfte des Proteins, ein lichtkontrolliertes Cystein wurde in Chromophornähe auf der N-terminalen Hälfte lokalisiert. Spaltung mit *2-Nitro-5-thiocyanobenzoessäure* (NTCB) ergab in Übereinstimmung damit die Lokalisierung eines reaktiven Cysteins auf der N-terminalen Hälfte in Position 222.
- (6) Die *Photokonversion* von verschiedenartig modifiziertem Phytochrom und unmodifiziertem Phytochrom als Referenz wurde sowohl bei tiefen Temperaturen (Messung von Absorption und Circular-Dichroismus) als auch bei Raumtemperatur mit Hilfe von Laser-Anregung und darauf folgender schneller kinetischer Messung untersucht.
- (7) Für den *photochemischen Primärprozeß*  $P_r \rightarrow \text{lumi-R}$  wird eine Z-E-Isomerisierung angenommen. Hierfür sprechen sowohl eine geringe, isotopenunabhängige Aktivierungsenergie als auch der Circular-Dichroismus von lumi-R im Vergleich zu  $P_r$  und die geringe Beeinflussbarkeit dieses Prozesses durch chemische Modifizierung des Apoproteins.
- (8) Die *Folgeprozesse* der  $P_{fr}$ -Bildung beinhalten thermische Relaxationen des Chromophors und der Proteinkomponente, wobei die Schritte nach Bildung des zweiten Intermediates meta- $R_a$  hauptsächlich mit Konformationsänderungen des Proteins verbunden sind. Dies konnte anhand von Viscositätseffekten, Beeinflussung der Bildung des Endproduktes durch chemische Modifizierung (chemische Bleichung) und an dieser Stelle erstmals durch vom Tetrapyrrol-Chromophor unabhängige Beobachtung der Konformationsänderungen am Protein mit Hilfe der chemischen Sonde *Fluoresceinquicksilberacetat* (FMA) gezeigt werden. Dabei werden hydrophobe Bereiche, die sich in der  $P_{fr}$ -Form an der Proteinoberfläche befinden, erst im letzten Schritt der Photo-Umwandlung exponiert.
- (9) Es gelang, Phytochrom an *Zellkernen* aus etiolierten Haferkeimlingen nachzuweisen. Die hierbei gefundene Phytochromkonzentration bewegte sich allerdings in der gleichen Größenordnung wie die im Cyto-

plasma. Ebenso konnte mit *N*-Iodoacetyl-*N'*-(8-sulfo-1-naphthyl)-ethylendiamin (1,8-IAEDANS) fluoreszenzmarkiertes Phytochrom nicht an Zellkerne gebunden werden. Hingegen wurde durch chemische Modifizierung kontrolliert denaturiertes Haferphytochrom erfolgreich zur *in vitro* Transcription an isolierten Roggenzellkernen eingesetzt. Hierbei bewirkten selbst Species mit stark denaturierter Proteinkomponente (ebenso wie intaktes 124 kDa Phytochrom) eine signifikante Steigerung der Transcriptionsrate. Dies liefert Hinweise darauf, daß nicht nur lichtkontrollierbare, sondern auch lichtunabhängige Domänen mit funktionell wichtiger Bedeutung vorhanden sind.

- (10) In Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Untersuchungen des Circular-Dichroismus, der Affinität gegenüber monoclonalen Antikörpern und der Proteolyse-Eigenschaften konnten die dort gefundenen Unterschiede zwischen  $P_n$  und  $P_{fr}$  nun auch auf chemischem Wege bestätigt werden. Als Ursache hierfür werden Konformationsänderungen auf der Proteinoberfläche in relativer Chromophornähe angenommen, die die chemische Reaktivität von  $P_{fr}$  erhöhen. Dies konnte ebenfalls mit Hilfe der chemischen Sonde FMA bestätigt werden.

## 6. LITERATUR

1. *Aramendia, P.F., B.P. Ruzsicska, S.E. Braslavsky und K. Schaffner* (1987). Laser Flash Photolysis of 124 kdalton Oat Phytochrome in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O Solutions. Formation and Decay of the I<sub>700</sub> Intermediates. *Biochemistry* 26, 1418-1422
2. *Berkelman, T.R. und J.C. Lagarias* (1986). Visualization of Bilin-linked Peptides and Proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 156, 194-201
3. *Borthwick, H.A., S.B. Hendricks, M.W. Parker, E.M. Toole und V.K. Toole* (1952). A photoreversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38, 662-666
4. *Braslavsky, S.E., A.R. Holzwarth, E. Langer, H. Lehner, J.I. Matthews und K. Schaffner* (1980 a). Conformational heterogeneity and photochemical changes of biliverdin dimethyl esters in solution. In J. De GREEF (Ed.), *Photoreceptors and Plant Development* (S. 89-100). Antwerpen; University Press
5. *Braslavsky, S.E., J.I. Matthews, H.J. Herbert, J. de Kok, C.J.P. Spruit und K. Schaffner* (1980 b). Characterization of a microsecond intermediate in the laser flash photolysis of small phytochrome from oat. *Photochem. Photobiol.* 31, 417-420
6. *Burke, M.J., D.C. Pratt und A. Moscovitz* (1972). Low-Temperature Absorption and Circular Dichroism Studies of Phytochrome. *Biochemistry* 11, 4025-4031
7. *Burtnick, L.D.* (1984). Modification of Actin with Fluorescein Isothiocyanate. *Biochim. Biophys. Acta* 791, 57-62
8. *Butler, W.L.* (1972). Photochemical properties of phytochrome in vitro. In K. MITRAKOS und W. SHROPSHIRE (Eds.), *Phytochrome* (S. 185-192). New York; Academic Press

9. *Butler, W.L., K.H. Norris, H.W. Siegelman und S.B. Hendricks* (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 1703-1708
10. *Butler, W.L., H.W. Siegelman und C.O. Miller* (1964). Denaturation of Phytochrome. *Biochemistry* 3, 851-857
11. *Cantor, C.R. und P.R. Schimmel* (1980). *Biophysical Chemistry. Part II. Techniques for the study of biophysical structure and function.* W.H. Freeman & Co., San Francisco
12. *Chai, Y.G., B.R. Singh, P.-S. Song, J. Lee und G.W. Robinson* (1987). Purification and Spectroscopic Properties of 124 kDa Oat Phytochrome. *Analyt. Biochem.* 163, 322-330
13. *Chai, Y.G. und P.-S. Song* (1986). Preparation and Properties of Highly Purified 124-kDalton Phytochrome (*Avena*). *Photochem. Photobiol.* 43 Supplement, 37 S
14. *Chen, Y.-R. und S.J. Roux* (1986). Characterization of Nucleoside Triphosphatase Activity in Isolated Pea Nuclei and Its Photoreversible Regulation by Light. *Plant Physiol.* 81, 609-613
15. *Chrambach, A., R.A. Reisfeld, M. Wyckoff und J. Zaccari* (1967). A Procedure for Rapid and Sensitive Staining of Protein Fractionated by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 20, 150
16. *Clarke, J.H. und M. Martinez-Carrion* (1986). Labelling of Functionally Sensitive Sulfhydryl-containing Domains of Acetylcholine Receptor from *Torpedo californica* Membranes. *J. Biol. Chem.* 261, 10 063 - 10 072
17. *Cooper, T.G.* (1981). *Biochemische Arbeitsmethoden* (S. 374-375). Berlin, New York; W. de Gruyter
18. *Condonnier, M.-M., H. Greppin und L.H. Pratt* (1985). Monoclonal Antibodies with Differing Affinities to the Red-Absorbing and Far-Red-Absorbing Forms of Phytochrome. *Biochemistry* 24, 3246-3253

19. *Cordonnier, M.-M., P. Mathis und L.H. Pratt* (1981). Phototransformation kinetics of undegraded oat and pea phytochrome initiated by laser flash excitation of the red-absorbing form. *Photochem. Photobiol.* 34, 733-740
20. *Cross, D.R., H. Linschitz, V. Kasche und J. Tenenbaum* (1968). Low-temperature studies on phytochrome: Light and dark reactions in the red to far-red transformation and new intermediate forms of phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 1095-1101
21. *Datta, N. und S.J. Roux* (1985). A rapid procedure for the purification of 124 kDalton phytochrome from *Avena*. *Photochem. Photobiol.* 41, 229-232
22. *Eilfeld, P.H.* (1984). Isolierung und chemische Modifizierung von 124 kD-Phytochrom aus *Avena sativa* L. . Diplomarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München
23. *Eilfeld, P.G. und W. Rüdiger* (1984). On the Reactivity of Native Phytochrome. *Z. Naturforsch.* 39c, 742-745
24. *Eilfeld, P.G. und W. Rüdiger* (1985). Absorption Spectra of Phytochrome Intermediates. *Z. Naturforsch.* 40c, 109-114
25. *Ernst, D. und D. Oesterheld* (1984). Purified phytochrome influences *in vitro* transcription in rye nuclei. *EMBO J.* 3, 3075-3078
26. *Fersht, A.* (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*. New York; Freeman & Co.
27. *Furuya, M.* (1983). Molecular properties of phytochrome. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 303, 361-375
28. *Gardner, G. und W. Briggs* (1974). Some properties of phototransformation of rye phytochrome *in vitro*. *Photochem. Photobiol.* 19, 367-377
29. *Glazer, A.N., R.J. Delange und D.S. Sigman* (1982). *Chemical Modification of Proteins: Selected Methods and Analytical Procedures*. Amsterdam, New York, Oxford; Elsevier Biomedical Press

30. *Grimm, R., F. Lottspeich, H.A.W. Schneider und W. Rüdiger* (1986). Investigation of the peptide chain of 124 kDa phytochrome: Localization of proteolytic fragments and epitopes for monoclonal antibodies. *Z. Naturforsch.* 41c, 993-1000
31. *Grimm, R. und Rüdiger, W.* (1986). A Simple and Rapid Method for Isolation of 124 kDa Oat Phytochrome. *Z. Naturforsch.* 41c, 988-992
32. *Hartmann, K.M. und W. Haupt* (1982). Photomorphogenese. In W. HOPPE, W. LOHMANN, H. MARKL und H. ZIEGLER (Eds.), *Biophysik* (S. 561-579). Berlin, Heidelberg, New York; Springer
33. *Heihoff, K., S.E. Braslavsky und K. Schaffner* (1987). Study of 124 kDalton Oat Phytochrome Photoconversions *in vitro* with Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy. *Biochemistry* 26, 1422-1427
34. *Heitz, J.R. und B.M. Anderson* (1968). Selective Binding of Fluorescein Mercuric Acetate to Yeast Alcohol Dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 127, 637-644
35. *Hermann, G., K.-J. Appenroth, E. Müller und H. Augsten* (1985). Re-examination of the partial quantum yields for the phytochrome photo-conversion by adequate photokinetic methods. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 180, 533-542
36. *Hermann, G. und E. Müller* (1980). Modifizierung der SH-Gruppen im Phytochrommolekül mit 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) und Quecksilberionen. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 175, 755-763
37. *Hershey, H.P., R.F. Barker, K.B. Idler, J. Lissemore und P.H. Quail* (1985). Analysis of cloned cDNA and genomic sequences for phytochrome: Complete amino acid sequences for two gene products expressed in etiolated *Avena*. *Nucl. Acids Res.* 13, 8543-8559
38. *Hoppe, W., W. Lohmann, H. Markl und H. Ziegler* (1982). *Biophysik* (S. 742). Berlin, Heidelberg, New York; Springer
39. *Houk, J., T. William und S.V. Putnam* (1973). Location of the Creatine Phosphokinase Binding Site of Myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1271-1277

40. *Hunt, R.E. und L.H. Pratt* (1981). Physicochemical Differences Between the Red- and the Far-Red-Absorbing Forms of Phytochrome. *Biochemistry* 20, 941-945
41. *Inoue, Y. und M. Furuya* (1985). Phototransformation of the red-light-absorbing form of phytochrome to the far-red-light-absorbing form of phytochrome in pea epicotyl tissue measured by a multichannel transient spectrum analyzer. *Plant Cell Physiol.* 26, 813-819
42. *Jones, A.M. und P.H. Quail* (1986). Quaternary Structure of 124 Kilo-dalton Phytochrome from *Avena sativa* L. . *Biochemistry* 25, 2987-2995
43. *Kadota, A., Y. Inoue und M. Furuya* (1986). Dichroic Orientation of Phytochrome Intermediates in the Pathway from  $P_r$  to  $P_{fr}$  as Analyzed by Double Flash Irradiations in Polarotropism of *Adiantum* Protonemata. *Plant Cell Physiol.* 27, 867-873
44. *Karush, F., N.R. Klinman und R. Marks* (1964). An Assay Method for Disulfid Groups by Fluorescence Quenching. *Anal. Biochem.* 9, 100-114
45. *Kelly, J.M. und J.C. Lagarias* (1985). Photochemistry of 124-kilo-Dalton *Avena* phytochrome under constant illumination *in vitro*. *Biochemistry* 24, 6003-6010
46. *Kerscher, L.* (1983). Subunit Size, Absorption Spectra, and Dark Reversion Kinetics of Rye Phytochrome Purified in the Far-red Absorbing Form. *Plant Sci. Lett.* 22, 133-138
47. *Kraml, M., M. Enders und N. Bürkel* (1984). Kinetics of the dichroic reorientation of phytochrome during photoconversion in *Mougeotia*. *Planta* 161, 216-222
48. *Laemmli, U.K.* (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-684
49. *Lagarias, J.C., J.M. Kelly, K.L. Cyr und W.O. Smith jr.* (1987). Comparative photochemical analysis of highly purified 124 kilodalton oat and rye phytochromes *in vitro*. *Photochem. Photobiol.* 46, 5-13

50. *Lagarias, J.C. und F.M. Mercurio* (1985). Structure Function Studies on Phytochrome. Identification of Light-Induced Conformational Changes in 124 kDa *Avena* Phytochrome *in vitro*. J. Biol. Chem. 260, 2415-2423
51. *Laidler, K.J.* (1970). Reaktionskinetik I (S. 29-32). Mannheim, Wien, Zürich, Bibliographisches Institut
52. *Linschitz, H. und V. Kasche* (1967). Kinetics of phytochrome conversion: multiple pathways in the  $P_r$  to  $P_{fr}$  reaction, as studied by double flash technique. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1059-1064
53. *Linschitz, H., V. Kasche, W.L. Butler und H.W. Siegelman* (1966). The kinetics of phytochrome conversion. J. Biol. Chem. 241, 3395-3403
54. *Litts, J.C., J.M. Kelly und J.C. Lagarias* (1983). Structure-Function Studies on Phytochrome. J. Biol. Chem. 258, 11 025 - 11 031
55. *LKB* (1986). Important User Information: Introduction to the LKB Midget Electrophoresis Program. LKB Producter AB, Bromma, Schweden
56. *Maurer, R.* (1983). Einfluß der Umgebung und chemischen Modifikation auf das photochemische Verhalten von Bacteriorhodopsin. Diplomarbeit, Technische Universität München
57. *Maurer, R.* (1987). Der Photozyklus des Bacteriorhodopsins. Konsistente Beschreibung der optischen Dichteänderungen durch ein kinetisches Modell unter Berücksichtigung von Änderungen in Temperatur und pH-Wert (mit Hilfe rechnergestützter Methoden). Dissertation, Technische Universität München
58. *Maurer, R., J. Vogel und S. Schneider* (1987 a). Analysis of flash photolysis data by a global fit with multi-exponentials I. Determination of the minimal number of intermediates in the photocycle of bacteriorhodopsin by the "stability criterion". Photochem. Photobiol. 46, 247-253

59. Maurer, R., J. Vogel und S. Schneider (1987 b). Analysis of flash photolysis data by a global fit with multi-exponentials II. Determination of consistent natural rate constants and the absorption spectra of the transient species in the bacteriorhodopsin photocycle from measurements at different temperatures. *Photochem. Photobiol.* 46, 255-262
60. Mayr, U., R. H. Hensel, M. Deparade, E. Pauly, F. Pfleiderer und E. Trommer (1982). Structure-function relationship in the allosteric L-Lactate Dehydrogenases from *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus curvatus*. *Eur. J. Biochem.* 126, 540-558
61. Means, G.E. und R.E. Feeny (1971). *Chemical Modification of Proteins*. San Francisco, Cambridge, London, Amsterdam; Holden Day Inc.
62. Merril, C.R., D. Goldman und M.L. van Keuren (1983). Silver Staining Methods for Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods Enzymol.* 96, 230-239
63. Moon, D.-K., G.-S. Jeon und P.-S. Song (1984). Phototransformation of 124 kDa phytochrome in D<sub>2</sub>O. *Photochem. Photobiol.* 39, 84 S
64. Moon, D.-K., G.-S. Jeon und P.-S. Song (1985). Effects of D<sub>2</sub>O on the properties of 124 kDalton phytochrome. In: "European Symposium Photomorphogenesis in Plants, Wageningen, 15.-19. April 1985", Book of Abstracts, S. 89
65. Mössinger, E., A. Batschauer, R. Vierstra, K. Apel und E. Schüfer (1987). Comparison of the effects of exogenous native phytochrome and *in vivo* irradiation on *in vitro* transcription in isolated nuclei from oat seedlings. *Planta* 170, 505-514
66. Mössinger, E. und E. Schüfer (1984). *In vivo* phytochrome control of *in vitro* transcription rates in isolated nuclei from oat seedlings. *Planta* 161, 444-450
67. Parodi, L.A., R.H. Lozier, S.M. Bhattacharjee und J.F. Nagle (1984). Testing kinetic models for the bacteriorhodopsin photocycle II. Inclusion of an O to M back-reaction. *Photochem. Photobiol.* 40, 501-512

68. Pratt, L.H. (1978). Phytochrome: Function and Properties. In V.C. SMITH (Ed.), Photochemical and Photobiological Reviews, Bd. 4 (S.59-124). New York, London; Plenum Press
69. Pratt, L.H. and W. Butler (1968). Stabilization of phytochrome intermediates by low temperatures. Photochem. Photobiol. 8, 477-485
70. Pratt, L.H., Y. Inoue and M. Furuya (1984). Photoactivity of transient intermediates in the pathway from the red-absorbing to the far-red-absorbing form of *Avena* phytochrome as observed by a double-flash transient spectrum analyzer. Photochem. Photobiol. 39, 241-246
71. Pratt, L.H., Y. Shimazaki, Y. Inoue and M. Furuya (1982). Analysis of phototransformation intermediates in the pathway from the red-absorbing to the far-red absorbing form of *Avena* phytochrome by a multichannel transient spectrum analyzer. Photochem. Photobiol. 36, 471-477
72. Quail, P.H., J.T. Colbert, H.P. Hershey and R.D. Vierstra (1983). Phytochrome: Molecular Properties and Biosynthesis. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 303, 387-402
73. Quail, P.H., J.T. Colbert, N.K. Peters, A.H. Christensen, R.A. Sharrock and J.L. Lissemore (1986). Phytochrome and the regulation of the expression of its genes. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 314, 469-480
74. Reiff, U., P.G. Eilfeldt and W. Rüdiger (1985). A Photoreversible 39 kDalton Fragment from the P<sub>fr</sub> Form of 124 kDalton Oat Phytochrome. Z. Naturforsch. 40c, 693-698
75. Rinderknecht, H. (1960). A New Technique for the Fluorescence Labelling of Proteins. Experientia 16, 430-431
76. Riordan, J.F. and B.L. Vallee (1972). Reactions with N-Ethylmaleimide and p-Mercuribenzoate. Methods Enzymol. 25, 449-456

77. *Rüdiger, W.* (1972). Isolation and Purification of Phytochrome. In K. MITRAKOS und W. SHROPSHIRE jr. (Eds.), *Phytochrome* (S. 108-125). London, New York; Academic Press
78. *Rüdiger, W. und D.L. Correll* (1969). Über die Struktur des Phytochrom-Chromophors und seine Protein-Bindung. *Liebigs Ann. Chem.* 723, 208-212
79. *Rüdiger, W., P.G. Eilfeld und F. Thümmel* (1985). Phytochrome, the visual pigment of plants: chromophore structure and chemistry of photoconversion. In G. BLAUER und H. SUND (Eds.), *Optical Properties and Structure of Tetrapyrroles* (S. 349-366). Berlin, Heidelberg, New York, W. de Gruyter
80. *Ruzsicska, B.P., S.E. Braslavsky und K. Schaffner* (1985). The kinetics of the early stages of the phytochrome photoconversion  $P_r$  to  $P_{fr}$ . A comparative study of small (60 kDalton) and native (124 kDalton) phytochromes from oat. *Photochem. Photobiol.* 41, 681-688
81. *Sanger, F. und L.F. Smith* (1957). Die Struktur des Insulins. *Endeavour* 16, 48-53
82. *Sankar, H.K. und P.-S. Song* (1981). Phototransformation and dark reversion of phytochrome in deuterium oxide. *Biochemistry* 20, 4315-4320
83. *Sankar, H.K. und P.-S. Song* (1982). Blue light induced phototransformation of phytochrome in the presence of flavine. *Photochem. Photobiol.* 35, 243-246
84. *Sasaki, N., Y. Oji, T. Yoshizawa, K.T. Yamamoto und M. Furuya* (1986). Temperature dependence of absorption spectra of 114 kDa pea phytochrome and relative quantum yield of its phototransformation. *Photochem. Photobiophys.* 12, 243-251
85. *Schegk, E.S., J. Tittor, F. Lottspeich und D. Oesterhelt* (1986). Protein chemistry of halorhodopsin based on its cysteine residue. In W. VOELTER, E. BAYER, Y.A. OVICHINNIKOV und V.T. IVANOV (Eds.), *Chemistry of Peptides and Proteins* (Bd. 3, S. 259-271). Berlin, New York; W. de Gruyter

86. Scheuerlein, R., P.G. Eilfeld und W. Rüdiger (1986). Single and double flash photoconversion of phytochrome *in vivo* and *in vitro*. J. Plant Physiol. 126, 119-134
87. Schwarz, H. und H.A.W. Schneider (1987). Immunological assay of phytochrome in small sections of roots and other organs of maize (*Zea mays* L.) seedlings. Planta 170, 152-160
88. Sedmark, J.J. und S.E. Grossburg (1977). A Rapid, Sensitive and Versatile Assay for Proteins Using Coomassie Brilliant Blue G 250. Analyt. Biochem. 79, 544-552
89. Serlin, B.S. und S.J. Roux (1986). Light-induced import of the chromoprotein, phytochrome, into mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 848, 372-377
90. Shimazaki, Y., Y. Inoue, K.T. Yamamoto und M. Furuya (1980). Photo-transformation of undegraded pea phytochrome by laser flash excitation. Plant Cell Physiol. 21, 1619-1625
91. Sinsheimer, J.E., V. Jagodic und J.H. Burckhalter (1974). Fluorescein Isothiocyanates: Improved Synthesis and Purity - Spectral Studies. Anal. Biochem. 57, 227-231
92. Song, P.-S. (1985). The molecular model of phytochrome deduced from optical probes. In G. BLAUER und H. SUND (Eds.), Optical Properties and Structures of Tetrapyrroles (S. 331-348). Berlin, Heidelberg, New York; W. de Gruyter
93. Song, P.-S., Qu. Chue und M. Sun (1974). Luminescence and phototautomerism of phytochrome and flavins. In J.B. BIRKS (Ed.), Excited States of Biological Molecules (S. 262-271). New York; John Wiley
94. Spruit, C.J.P., R.E. Kendrick und R.J. Cooke (1975). Phytochrome Intermediates in Freeze-dried Tissue. Planta 127, 121-132
95. Stark, G.R. (1977). Cleavage of Cysteine after Cyanylation. Methods Enzymol. 47, 129-132

96. *Sundqvist, C. und L.O. Björn* (1983). Light-induced linear dichroism in photoreversibly photochromic sensor pigments II. Chromophore rotation in immobilized phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 37, 69-75
97. *Swoboda, G. und W. Hasselbach* (1985). Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with Thiol and Amino Groups of Sarcoplasmic ATPase. *Z. Naturforsch.* 40c, 863-875
98. *Thomas, B. und S.E. Penn* (1986). Monoclonal antibody ARC MAC 50.1 binds to a site on the phytochrome molecule which undergoes a photo-reversible conformational change. *FEBS Lett.* 195, 174-178
99. *Thomas, B., S.E. Penn, G.W. Butcher und G. Galfre* (1984). Discrimination between the red- and far-red absorbing forms of phytochrome from *Avena sativa* L. by monoclonal antibodies. *Planta* 160, 382-384
100. *Thümmler, F., P.G. Eilfeld, W. Rüdiger, D.-K. Moon und P.-S. Song* (1985). On the Chemical Reactivity of the Phytochrome Chromophore in the P<sub>r</sub> and P<sub>fr</sub> Form. *Z. Naturforsch.* 40c, 215-218
101. *Thümmler, F. und W. Rüdiger* (1984). Chromophore structure in phytochrome intermediates and bleached forms of phytochrome. *Physiol. Plantarum* 60, 378-382
102. *Thümmler, F., W. Rüdiger, E. Cmiel und S. Schneider* (1983). Chromopeptides from Phytochrome and Phycocyanin. NMR Studies of the P<sub>fr</sub> and P<sub>r</sub> Chromophore of Phytochrome and E,Z Isomeric Chromophores of Phycocyanin. *Z. Naturforsch.* 38c, 359-368
103. *Tobin, E.M. und W.R. Briggs* (1973). Studies on the Protein Conformation of Phytochrome. *Photochem. Photobiol.* 18, 487-495
104. *Tsong, T.Y. und R.L. Baldwin* (1972). Kinetic Evidence for Intermediate States in Unfolding of Ribonuclease A II: Kinetics of Exposure to Solvent of a Specific Dinitrophenyl Group. *J. Mol. Biol.* 69, 149-153
105. *van Liew, H.D.* (1967). Graphik analysis of aggregates of linear and exponential processes. *J. Theor. Biol.* 16, 43-53

106. Vierstra, R.D. und P.H. Quail (1983a). Purification and Initial Characterization of 124 kilodalton Phytochrome from *Avena*. *Biochemistry* 22, 2498-2505
107. Vierstra, R.D. und P.H. Quail (1983b). Photochemistry of 124 Kilo-dalton *Avena* Phytochrome *in vitro*. *Plant Physiol.* 72, 264-267
108. Vierstra, R.D., P.H. Quail, T.-R. Hahn und P.-S. Song (1987). Comparison of the protein conformations between different forms ( $P_r$  and  $P_{fr}$ ) of native (124 kDa) and degraded (118/114 kDa) phytochromes from *Avena sativa* L. . *Photochem. Photobiol.* 45, 429-432
109. Vogel, J. (1981). Zum Einfluß innerer Freiheitsgrade auf die Rate der strahlungslosen Desaktivierung elektronisch angeregter organischer Moleküle. Dissertation, Technische Universität München
110. Vogel, J., G. Knoth, M. Melzig, E. Cmiel, S. Schneider und F. Dörr (1983). 2-(2-Pyridinyl)-1-(3-pyridinyl)-ethanone: Photoinduced proton transfer and isomerization. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* 87, 391-396
111. Wong, Y.-S., H.-C. Cheng, D.A. Walsh und J.C. Lagarias (1986). Phosphorylation of *Avena* Phytochrome *in vitro* as a Probe of Light-induced Conformational Changes. *J. Biol. Chem.* 261, 12 089 - 12 097
112. Wu, C.-W. und L. Stryer (1972). Proximity Relationships in Rhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1104-1108
113. Yamamoto, K.T. und M. Furuya (1983). Spectral Properties of Chromophore-Containing Fragments Prepared from Pea Phytochrome by Limited Proteolysis. *Plant Cell Physiol.* 24, 713-718
114. Yamamoto, K.T. und W.O. Smith (1981). A re-evaluation of the mole fraction of  $P_{fr}$  at the red-light-induced photostationary state of un-degraded rye phytochrome. *Plant Cell Physiol.* 22, 1159-1164
115. Yoshizawa, T. und G. Wald (1963). Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments. *Nature* 197, 1279-1286

## LEBENS LAUF

- 03.12.1960      Geboren in München als Tochter von Günter MEHLIS  
                  und seiner Ehefrau Kunigunda geb. NEIDEL  
                  seit 25.04.1983 verheiratet mit Peter G. EILFELD
- 1967 - 1980      Schulzeit :  
                  4 Jahre Grundschule in München, danach Besuch des  
                  neusprachlichen Gymnasiums in München  
                  27.06.1980    Erlangung der allgemeinen Hochschulreife
- Juni 1980 -      Seniorenbetreuung und Krankenpflege (Ökumenische  
Okt. 1980      Sozialstation Bogenhausen)
- Sept. 1980 -      Studium der Biologie und der Organischen Chemie  
Nov. 1984      an der Ludwig-Maximilians-Universität, München :  
                  Mai 1983    Diplomvorprüfung  
                  März 1984    letzte mündliche Diplomhauptprüfung  
                  Febr. - Nov. 1984    Diplomarbeit am Botanischen  
                  Institut der Universität München
- Jan. 1985      Beginn der Dissertation am Botanischen Institut  
                  der Universität München unter Leitung von Prof.  
                  Dr. W. RÜDIGER
- Jan. 1985 -      wissenschaftliche Hilfskraft am Botanischen Institut  
Dez. 1987      der Universität München









